

Aus dem Institut
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin
in Berlin

DISSERTATION

Kristallstrukturanalyse des kohlenhydratbindenden Moduls 27-1
der β -Mannanase 26 aus *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* im
Komplex mit Mannohexaose
und
Kristallisation der ATPase HP0525
aus *Helicobacter pylori*

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von
Diplom-Biotechnologin
Yvette Roske
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Höhne

2. Prof. Dr. Udo Heinemann

3. Prof. Dr. Robert Seckler

Datum der Promotion: 13. 12. 2004

INHALTSVERZEICHNIS

I. THEORIE DER RÖNTGENSTRUKTURANALYSE	12
1. Beugung von Röntgenstrahlen am Kristall	12
2. Das Phasenproblem.....	14
3. Strukturverfeinerung	15
 II. DAS KOHLENHYDRAT BINDENDE MODUL CBM27-1 DER β-MANNANASE VON CALDICELLULOSIRUPTOR, STAMM RT8B.4	 17
1. EINLEITUNG.....	17
1.1 Polysaccharid abbauende Enzyme	17
1.1.1 Glycosidhydrolasen und ihre Klassifikation.....	17
1.1.2 Kohlenhydrat bindende Module	18
1.1.3 Der katalytische Spaltmechanismus.....	19
1.1.4 β -Mannanasen und β -Mannosidasen	20
1.2 Das Substrat.....	23
1.2.1 Mannan	23
1.3 Anwendung von Enzymen extremophiler Organismen.....	23
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
2.1 Klonierung, Expression und Proteinreinigung	26
2.1.1 Natives Protein CsCBM27-1	26
2.1.2 Selenomethionin substituiertes Protein CsCBM27-1	27
2.2 Bindungsstudien von Mannooligosacchariden an CsCBM27-1	28
2.3 Kristallographische Methoden	29
2.3.1 Kristallisation und Kryoprotektion	29

2.3.1.1 CsCBM27-1 in Komplex mit Mannoheptaose	29
2.3.1.2 Natives Protein CsCBM27-1 ohne Substrat	29
2.3.2 Sammlung von Röntgendiffraktionsdaten	30
2.3.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung	30
2.3.3.1 SAD-Daten des CsCBM27-1/Mannoheptaose-Komplexes	30
2.3.3.2 Natives CsCBM27-1 ohne Substrat	31
2.4 Nachweis der Selenanlagerung	32
3. Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1 Proteinexpression und Reinigung.....	33
3.2 Mannooligosaccharid-Bindung an CsCBM27-1	33
3.3 Kristallisation	34
3.3.1 CsCBM27-1 / Mannoheptaose-Komplex	34
3.3.2 Natives Protein CsCBM27-1	35
3.4 Feststellen der Selenanlagerung	36
3.5 Datensammlung.....	38
3.6 Phasenbestimmung, Strukturanalyse und Verfeinerung.....	40
3.6.1 Komplexstruktur: CsCBM27-1 mit Mannoheptaose	40
3.6.2 CsCBM27-1 ohne Substrat.....	42
3.7 Die Kristallstruktur von CsCBM27-1 in Komplex mit Mannoheptaose.....	44
3.8 Vergleich der Kristallstrukturen der freien und Liganden-gebundenen CsCBM27-1 Struktur	49
3.9 Ähnlichkeit zu anderen CBMs	51
3.9.1 Vergleich der beiden strukturellen Vertreter der CBM27 Familie	52
3.10 Die Rolle des Kalziums für die Ligandenbindung und Stabilität von CsCBM27-1	55
3.11 Einfluss von Temperatur auf die Bindung des Zuckers an CsCBM27-1	56
3.12 Superfamilie der CBMs	58
4. INTERPRETATION UND BEWERTUNG DER ERGEBNISSE.....	60
 III. DIE HEXAMERE ATPASE HP0525 AUS <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	62
1. EINLEITUNG.....	62
1.1 Die bakterielle Konjugation	62
1.1.1 Kopplungsproteine	63
1.2 Die Rolle des Typ IV Sekretionssystems.....	64
1.3 HP0525 ist eine VirB11 ATPase.....	65

2. MATERIAL UND METHODEN.....	67
2.1 Proteinexpression und Reinigung.....	67
2.1.1 Allgemeine Methoden	67
2.1.2 Natives HP0525	68
2.1.2.1 Klonierung und Transformation.....	68
2.1.2.2 Expression, Zellernte und -aufschluss	68
2.1.2.3 Proteinreinigung	69
2.1.3 Selenomethionin-substituiertes HP0525	71
2.1.3.1 DNA-Isolierung und Transformation	71
2.1.3.2 SeMet- HP0525 Expression, Zellernte und -aufschluß	72
2.1.3.3 Reinigung des SeMet-HP0525.....	73
2.2 Kristallisation von nativem und Selenomethionin (SeMet)-substituiertem HP0525	73
2.3 Röntgendiffraktionsexperimente	74
3. Ergebnisse und Diskussion.....	75
3.1 Proteinexpression und Reinigung.....	75
3.1.1 Natives HP0525	75
3.1.2 Selenomethionin-substituiertes HP0525	78
3.2 Kristallisation	82
3.3 Datenauswertung	83
3.4 Strukturdarstellung der ATPase HP0525	86
3.4.1 Die monomere Struktur von HP0525.....	86
3.4.2 Das hexamere Protein HP0525	87
IV. LITERATURANGABE.....	89

ZUSAMMENFASSUNG

Kohlenhydrat-bindende Module (CBMs) sind die bekanntesten nicht-katalytischen Module, die mit Enzymen assoziiert sind, welche die pflanzliche Zellwand hydrolysieren. Eine große Anzahl mutmaßlicher CBMs wurden durch Aminosäuresequenzvergleiche identifiziert. Jedoch konnte nur für einige die kohlenhydratbindende Funktion experimentell gezeigt werden. Die β -Mannanase 26 von *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Stamm Rt8B.4, ist eine thermostabile modulare Glycosidhydrolase, die N-terminal zwei dicht aufeinander folgende nicht-katalytische kohlenhydratbindende Module besitzt. Diese spezifisch β -Mannan bindenden CBMs wurden kürzlich als Mitglieder der CBM-Familie 27 klassifiziert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Kristallisation und Strukturanalyse des ersten kohlenhydratbindenden Moduls der β -Mannanase aus *C. saccharolyticus* (CsCBM27-1) mit einer gebundenen Mannohexaose und in ligandfreier Form beschrieben. Die Kristallstruktur des CsCBM27-1 mit der gebundenen Mannohexaose wurde durch die SAD-Methode und die Struktur des nativen CsCBM27-1 mit Molekularem Ersatz bestimmt. Grundlage für diese Arbeit waren Daten aus der isothermen Titrationskalorimetrie zur Quantifizierung der Affinität von CsCBM27-1 für lösliche Mannooligosaccharide. Mannohexaose zeigte die höchste Bindungskonstante mit K_a von $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Die hier präsentierte hochaufgelöste Kristallstruktur des ungebundenen (1,55 Å) und Mannohexaose gebundenen (1,06 Å) CsCBM27-1 erlaubt weitere Einblicke in die Interaktion β -Mannan bindender CBMs mit ihren entsprechenden Liganden. CsCBM27-1 zeigt eine typische *b-sandwich jellyroll*-Struktur mit einem gegenüber der Ligandenbindungsstelle gebundenen Kalziumion. Diese Anordnung ähnelt den Topologien, die für andere CBM-Familien gefunden wurden. In der Gesamtheit sind die Strukturen des CsCBM27-1 in freier und Ligand-gebundener Form identisch. Die Mannohexaosebindung wird durch drei dem Lösungsmittel zugängliche Tryptophanreste und einige direkte Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. Basierend auf Bestimmungen der Bindungsstärke und thermischen Entfaltungsexperimenten wird dem gebundenen Kalziumion eine entscheidende Rolle für die Thermostabilität des CsCBM27-1 zugewiesen. Die beobachtete höhere Affinität von CsCBM27-1 zu Mannooligosacchariden, verglichen zu anderen CBM 27-Familienmitgliedern,

wird durch die unterschiedliche Orientierung der an der Bindung beteiligten aromatischen Aminosäurereste erklärt.

Zum Schluss wird anhand der beobachteten Konservierung der strukturellen Position der konservierten Sequenzmotive und eines Kalziumions die Definition von verwandten CBM Familien zu einer Superfamilie bekräftigt.

Das Magengeschwür verursachende Eubakterium *Helicobacter pylori* verursacht wahrscheinlich die am häufigsten vorkommende chronische bakterielle Infektion beim Menschen, die chronische aktive Gastritis. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Reinigung und Kristallisation der ATPase Virb11 HP0525 aus *Helicobacter pylori*. ATPasen spielen eine Rolle bei der Assemblierung von Sekretionssystemen und/oder scheinen den Substrattransport durch ATP-Hydrolyse anzutreiben. Die ATPase VirB11 ist möglicherweise direkt an dem Transport von Proteinen durch die innere Membran beteiligt. Für die *cag*-Pathogenitätsinsel aus *H. pylori* HP0525 wurde durch Elektronenmikroskopie die Zusammenlagerung zu einer homohexameren Ringstruktur gezeigt. Die Ringe wurden durch Zugabe von ATP stabilisiert. Es wird vermutet, dass VirB11-Proteine vielleicht aktiv an dem Transport von Substraten beteiligt sind.

Das native Protein HP0525 ließ sich gut rekombinant herstellen und reinigen. Es wurde aus einer von mehreren Kristallisationsbedingungen durch Optimierung der Kristallisationskomponenten ausreichend große Kristalle erhalten, die gute Diffraktionseigenschaften bis 2,2 Å zeigten. Neben dem nativen Protein wurde Selenomethionin-substituiertes Protein synthetisiert und gereinigt. Von diesem Protein SeMet-HP0525, resultierten hexagonale Kristalle. Zur Derivat-Datensatzsammlung ist es aufgrund der Publikation der Kristallstruktur dieser hexameren ATPase HP0525 nicht mehr gekommen. Weitere strukturelle Untersuchungen an diesem Protein wurden als nicht mehr erforderlich angesehen.

SUMMARY

Carbohydrate-binding modules (CBMs) are the most common non-catalytic modules associated with enzymes active in plant cell-wall hydrolysis. Despite the large number of putative CBMs being identified by amino-acid sequence alignments, only few representatives have been experimentally shown to have a carbohydrate-binding function. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* strain Rt8B.4 Man26 is a thermostable modular glycoside hydrolase β -mannanase which contains two non-catalytic modules in tandem at its N-terminus. These modules were recently shown to function primarily as β -mannan-binding modules and have accordingly been classified as members of a novel family of CBMs, family 27.

In the first part of this study, the crystallization and crystal structure analysis of the first carbohydrate binding module (CsCBM27-1) of the β -mannanase from *C. saccharolyticus* in native and mannohexaose-bound form is described. The structure of CsCBM27-1 complexed with mannohexaose was determined by the SAD method and the structure of the ligandfree CsCBM27-1 with molecular replacement.

The basis for this study were data from isothermal titration calorimetry for quantifying the binding affinity of CsCBM27-1 for soluble mannooligosaccharides. The N-terminal CBM27 (CsCBM27-1) of ManA26 from *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4 displays high binding affinity towards mannohexaose with a K_a of $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Accordingly, the here presented high-resolution crystal structures of native CsCBM27-1 and its mannohexaose complex were solved at 1.55-Å and 1.06-Å resolution, respectively. Both structures permit further insights into the interaction of β -mannan binding CBMs with their corresponding ligands. CsCBM27-1 shows the typical β -sandwich jellyroll fold observed in other CBMs with a single calcium ion bound opposite to the ligand binding site. This α -arrangement is similar to topologies of other CBM families. The crystal structures reveal that the overall fold of CsCBM27-1 remains virtually unchanged upon sugar binding and that binding is mediated by three solvent-exposed tryptophan residues and few direct hydrogen bonds. Based on binding affinity and thermal unfolding experiments this structural calcium is shown to play a role in the thermal stability of CsCBM27-1. The higher binding affinity of CsCBM27-1 to mannooligosaccharides when compared to other members of CBM family 27

might be explained by the different orientation of the residues forming the "aromatic platform" and by differences in the length of loops.

Finally, evidence is presented, on the basis of fold similarities and the retention of the position of conserved motifs and a calcium, for the consolidation of related CBM families into a superfamily of CBMs.

The gastric ulcer causing eubacterium *Helicobacter pylori* is responsible for a frequently occurring chronic bacterial infection in human, chronic active gastritis. The second part of this study addressed the purification and crystallization of the VirB11 ATPase HP0525 of *Helicobacter pylori*. ATPases play a role in the assembly of secretion systems and/or may catalyse substrate transport by ATP hydrolysis. The VirB11 ATPase HP0525 may be directly involved in transport of proteins through the inner membrane. A homohexameric ring structure is shown for the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* by electronic microscopy.

The native HP0525 protein was produced in recombinant *Escherichia coli* and purified for crystallization. One of several crystallization experiments yielded large crystals by optimization of the concentration of the crystallization components. The crystals revealed good diffraction behavior up to 2,2 Å. In addition to the native protein, selenomethionine-substituted HP0525 was produced and purified. Hexagonal crystals were obtained from the SeMet-HP0525. No derivative datasets were collected, because the crystal structure of the hexameric ATPase HP0525 was published by Yeo et al. (2000). Further structural investigations for the protein HP0525 were judged unnecessary.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung mbH
CsCBM	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus Carbohydrate Binding Module</i>
Da	Dalton
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
β -D-Gal	β -D-Galactose
β -D-Glc	β -D-Glucopyranose
β -D-Man	β -D-Mannopyranose
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
GH26	Glykosidhydrolase Familie 26
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton (1000 atomare Gewichtseinheiten)
LB	Luria Bertani
Lys, K	Lysin
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfon-säure
NMM	<i>new minimal medium</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat

PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SeMet	Selenomethionin
<i>TmCBM</i>	<i>Thermotoga maritima Carbohydrate Binding Module</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminoethan-Hydrochlorid

I. Theorie der Röntgenstrukturanalyse

1. Beugung von Röntgenstrahlen am Kristall

Für die Strukturbestimmung von kleinen Molekülen bis hin zu Proteinen stehen im Wesentlichen zwei Verfahren zu Verfügung: die Röntgenstrukturanalyse und die magnetische Kernresonanz-spektroskopie (NMR). Während Lösungs-NMR in der Regel auf „kleine“ Proteinstrukturen bis maximal 20 - 30kDa limitiert ist, mit Ausnahme einiger neuer Techniken [1] die Studien von Strukturen mit Molekulargewichten > 100 kDa ermöglichen, gibt es für die Röntgenstrukturanalyse keine Obergrenze für die Masse der Proteine, solange geeignete Kristalle erhalten werden können.

Die Notwendigkeit, ein Protein aus einer Lösung in einen Proteinkristall zu überführen, ergibt sich aus den spezifischen Eigenschaften von Kristallen. Ein Kristall ist ein homogenes anisotropes Gebilde mit regelmäßiger periodischer Anordnung von Einheitszellen, die ein dreidimensionales Gitter aufspannen. Eine Strukturbestimmung an isolierten Molekülen ist aufgrund der schwachen Interaktion von Röntgenstrahlen mit der Materie nicht möglich. Durch die regelmäßige Anordnung der Moleküle in einem geordneten Kristallgitter wird die Interaktion der Röntgenstrahlen verstärkt.

Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist mit Atomabständen in Molekülen vergleichbar. Röntgenstrahlung einer rotierenden Kupfer-Anode (Cu-K α Strahlung: $\lambda = 1,54$ Å) oder Synchrotronstrahlung im Bereich $\lambda = 1$ Å sind gut geeignet, da organische Moleküle interatomare Bindungsabstände in dieser Größenordnung aufweisen. Eine Kohlenstoff-Kohlenstoff Einfachbindung besitzt zum Beispiel eine Länge von $1,5$ Å $= 1,5 \times 10^{-10}$ Meter.

Die räumliche Anordnung der Atome im Kristall wird aus den Beugungserscheinungen der Röntgenstrahlen an den verschiedenen Gitterebenen im Kristall abgeleitet. Dabei wird auf den Kristall ein Röntgenstrahl der Wellenlänge λ gestrahlt und dieser an parallelen Ebenen im Kristall, den Gitter- oder Netzebenen reflektiert. Der Beugungsvorgang an dieser Schar von Netzebenen wird durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben (William L. Bragg)[2, 3].

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

Eine Netzebenenschar bezeichnet alle parallelen Ebenen im Kristall, die eine identische Orientierung aufweisen. Der Winkel des einfallenden Röntgenstrahls zur entsprechenden Netzebenenschar wird mit Theta (θ) bezeichnet. Der Abstand der einzelnen Gitterebenen ist mit d und die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist mit Lambda (λ) bezeichnet. Bei einer festen Wellenlänge tritt konstruktive Interferenz an Netzebenen mit dem Abstand d auf, wenn der Winkel zwischen den Netzebenen und dem einfallendem bzw. ausfallendem Röntgenstrahl mit dem Braggwinkel Theta identisch ist. Der ganzzahlige Index n bezeichnet die Ordnung der Reflektion. Es wird im Experiment die Intensität der abgelenkten Welle (des Reflexes) gemessen und einer Netzebene im reziproken Raum des Kristallgitters zugeordnet, die durch die Millerschen Indizes h , k , und l gekennzeichnet ist. Das reziproke Gitter ist eine äquivalente formale Beschreibung eines Gitters und erleichtert die Interpretation von Röntgenbeugung an Kristallen. In einem Beugungsbild eines Kristalls entspricht jeder Reflex einer Beugung des Röntgenstrahls an einer Netzebenenschar (h , k , l) mit dem Netzebenenabstand d . Die Beugungsbilder sind also eine Art „Photographie“ des reziproken Gitters. Da jeder Reflex von einem an der Netzebene (h , k , l) gebeugten Röntgenstrahl herrührt, werden die Reflexe durch die Millerschen Indizes gekennzeichnet. Dies bezeichnet man als Indizieren der Reflexe eines Röntgenbildes. In der Symmetrie und den Abständen der Reflexe auf den Röntgenbildern steckt die Information über die Raumgruppe und die Dimension der Elementarzelle (Kristallgitter aus Elementarzellen aufgebaut). Die Schwärzung eines Reflexes ist ein Maß für die Intensität (I) eines Reflexes (h,k,l), die dem Quadrat der Strukturfaktoramplitude $|F(hkl)|$ proportional ist. In den Intensitäten der Beugungsreflexe steckt die Information über die Molekülstruktur.

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2$$

Der Strukturfaktor F_{hkl} ist eine vektorielle, komplexe Größe und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$F_{hkl} = |F(hkl)| \cdot e^{i\alpha_{hkl}}$$

mit $|F(hkl)|$ der Strukturfaktoramplitude und der Phase α_{hkl} . Durch Fourier-Transformation (reales Kristallgitter \leftrightarrow reziprokes Kristallgitter) kann man die Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ und damit den Inhalt einer Elementarzelle berechnen.

$$\mathbf{r}(x, y, z) = \frac{1}{V} \cdot \sum_{hkl} |F(hkl)| \cdot e^{i\mathbf{a} \cdot (hkl)} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Durch das Tripel (hkl) werden die Millerschen Indizes der Reflexe beschrieben und x, y, z sind die fraktionellen Koordinaten der Atome in einer Elementarzelle mit dem Volumen V. Das Problem bei der Röntgenstrukturanalyse ist aber, dass nur die Intensitäten der Reflexe gemessen werden und die Phaseninformation α_{hkl} beim Diffraktionsexperiment verloren geht.

2. Das Phasenproblem

Es gibt verschiedene Methoden, um an die Phaseninformation zu gelangen:

- Die Methode des molekularen Ersatzes. Hier muss ein Modell für die zu lösende Struktur vorliegen, das eine bekannte (oder homologe) Teilstruktur aufweist. Beispiele sind die Analyse von Mutanten, Inhibitor-komplexen oder homologen Proteinen. Es sind zwei Fälle zu unterscheiden. (1) Die zu untersuchende Struktur ist isomorph zu der bereits bekannten, d.h. sie hat dieselbe Elementarzelle und Raumgruppe. Dies ist vor allem bei Mutanten der Fall, oder bei Protein-Substrat-Komplexen. (2) Die zu untersuchende Struktur ist nicht isomorph. Dies ist bei homologen Proteinen der Fall oder bei Komplexen mit größeren Inhibitoren. Der bereits bekannte Teil der Struktur muss an den richtigen Punkt in der Elementarzelle translatiert und in die richtige Orientierung gebracht werden. Dies lässt sich durch eine Translations- und Rotationssuche mit schrittweisem Vergleich der gemessenen und berechneten Intensitäten (Beträge der Struktur-faktoren) durchführen.
- Anomale Diffraktion. Die Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist der Einbau von Atomen mit ausreichendem anomalen Streueffekt in das Proteinmolekül, z.B. Selen an Stelle von Schwefel in Methionin. Bei Diffraktion an der Absorptionskante der anomalen Streuer kommt es zu Resonanzeffekten, und die Phasenverschiebung ist für alle Streuer nicht mehr dieselbe (nämlich π), sondern es kommt zu einer intrinsischen Phasenverschiebung, die von π verschieden ist. Das Friedelsche Gesetz ist nicht länger gültig, $I(hkl) \neq I(-h, -k, -l)$. Die Datensammlung erfolgt für die Lösung des Phasenproblems durch die single wavelength anomalous dispersion (SAD) Methode oder bei drei verschiedenen definierten Wellenlängen durch die multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) Methode.

- Isomorpher Ersatz. Diese Methode beruht auf der definierten Einbringung schwerer Atome in den Kristall, d.h. der Bindung von elektronenreichen Atomen an das Protein. Mögliche Schweratome sind zum Beispiel Hg^{2+} (bindet an Cysteine), Sm^{3+} (Histidine). Zusätzlich zum nativen Datensatz ist mindestens ein isomorpher Derivatdatensatz erforderlich um die Phasen durch *single isomorphous replacement* (SIR) zu bestimmen. Eindeutig ist die Lösung durch *multiple isomorphous replacement* (MIR), wenn mindestens zwei Schweratomdatensätze mit verschiedenen Derivaten und unterschiedlichen Bindungsstellen aufgenommen werden. Bei den Methoden SIRAS und MIRAS wird zusätzlich die anomale Streuung (*anomalous scattering*) der Schweratome berücksichtigt.
- Direkte Methode. Die Phasen werden mit statistischen Methoden aus den gemessenen Intensitäten berechnet mit der Annahme, dass die Elektronendichte immer positiv ist. Voraussetzung hierfür ist ein Datensatz mit einer Auflösung unter 1 Å.

3. Strukturverfeinerung

Nach Lösung des Phasenproblems durch eine der in Abschnitt 2 vorgestellten Methoden erhält man ein anfängliches Strukturmodell, dass durch einen Satz von Atomkoordinaten die Struktur im Wesentlichen richtig beschreibt. Aus diesem Strukturmodell können wiederum die Strukturfaktoramplituden $|F(hkl)|_{\text{calc}}$ berechnet werden. Bei der Verfeinerung erfolgt eine Anpassung des Modells durch *least squares*-Minimierung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate oder *maximum likelihood*-Verfeinerungsmethoden an die experimentellen Daten, so dass die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden optimal mit den beobachteten Strukturfaktoramplituden $|F(hkl)|_{\text{obs}}$ übereinstimmen. Die Übereinstimmung zwischen $|F(hkl)|_{\text{obs}}$ und $|F(hkl)|_{\text{calc}}$ wird meist in einer Verfeinerungsstatistik durch den sogenannten R-Faktor ausgedrückt. Berechnet werden zwei R-Faktoren, der konventionelle (R_{cryst}) und der sogenannte freie (R_{free}). Beide werden durch die folgende Formel errechnet.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F(hkl)|_{\text{obs}} - k|F(hkl)|_{\text{calc}} \right|}{\sum_{hkl} |F(hkl)|_{\text{obs}}} \quad (\text{k: Skalierungsfaktor})$$

Für die Berechnung von R_{free} werden 57% der Reflexe in einem „Test-Set“ willkürlich ausgewählt, gegen die nicht verfeinert wird. R_{free} ist von den Minimierungsschritten unbeeinflusst und dient nur zur Vermeidung des „Überfitten“ (Parameter werden minimiert im Verlauf der Verfeinerung ohne das Modell dabei sinnvoll zu verfeinern) der Struktur. Der restliche Datensatz wird für die Verfeinerung herangezogen, und daraus wird der R_{cryst} bestimmt. Je besser die Übereinstimmung zwischen $|F(hkl)_{\text{obs}}|$ und $|F(hkl)_{\text{calc}}|$ desto geringer wird der R-Wert. R_{free} ist immer höher als R_{cryst} , die Differenz sollte jedoch nicht zu groß sein (ca. 2-5 %). Für die Verfeinerung bzw. Anpassung des Modells ist die Berechnung von Differenzdichtekarten $\Delta\rho$ sehr hilfreich, da diese Funktion an Stellen, an denen Atome falsch positioniert wurden, ein Minimum und an Orten, an denen Atome fehlen, ein Maximum zeigt.

$$\Delta\rho(xyz) = \sum_{hkl} \left[|F(hkl)_{\text{obs}}| - |F(hkl)_{\text{calc}}| \right] \cdot e^{ia(hkl, \text{calc})} \cdot e^{2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Bei der Verfeinerung liegt oft ein ungünstiges Verhältnis von Daten zu Parametern vor, welches durch die Auflösung des Datensatzes bestimmt wird. Unter Auflösung versteht man den kleinsten Gitterebenenabstand im Kristall, für den vollständige Beugungsdaten existieren. Um das Verhältnis von Daten zu Parametern zu verbessern, werden sogenannte *restraints* und *constraints* in die Verfeinerung eingeführt. Während durch die *restraints* die Zahl der Observablen erhöht wird, führen die *constraints* zu einer Verringerung der Zahl der Parameter durch Betrachtung mancher Atomgruppen als starr (z.B. Seitenkette von Tyrosin), wodurch sich die Zahl der Freiheitsgrade reduziert.

Verfeinerungskriterien neben den R-Faktoren, sind die mittleren quadratischen atomaren Auslenkungen der Atome um die Ruhelage (B-Faktoren), die verbleibende Differenzdichte und die mittleren quadratischen Abweichungen von Bindungslängen und -winkeln von Idealwerten. Ein weiteres wichtiges Stereochemisches Kriterium ist das Ramachandran-Diagramm der Hauptkettenkonformation, in dem ca. 90% aller Aminosäuren in den energetisch günstigen Bereichen liegen soll. Entscheidend für die Genauigkeit einer Struktur bleibt schlussendlich die Auflösung und die Datenqualität.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden zwei Kristallstrukturen vorgestellt. Die Struktur des CsCBM27-1 im Komplex mit einer Mannohexaose wurde mit der SAD-Methode bestimmt und die Struktur des nativen CsCBM27-1 Struktur mit Molekularem Ersatz.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Kristallisation der ATPase HP0525 aus *Helicobacter pylori*.

II. Das Kohlenhydrat bindende Modul CBM27-1 der β -Mannanase von *Caldicellulosiruptor*, Stamm Rt8B.4

1. EINLEITUNG

1.1 Polysaccharid abbauende Enzyme

1.1.1 Glycosidhydrolasen und ihre Klassifikation

Glycosidhydrolasen (EC 3.2.1.-) sind eine weitverbreitete Klasse von Enzymen, die die glycosidischen Bindungen in Oligo- und Polysacchariden spalten. Aufgrund der komplizierten Strukturen der Kohlenhydrate mit ihren unterschiedlichen Erscheinungsformen in der Natur ist eine Vielzahl an Enzymen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten erforderlich. Glycosidhydrolasen verschiedener Herkunft sind, basierend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz, in verschiedene Familien eingeteilt [4, 5, 6]. Zurzeit sind 87 Glycosidhydrolasefamilien klassifiziert, und einige von ihnen wurden intensiv studiert. Viele Glycosidhydrolasen bestehen aus einer Kombination von einer katalytischen und einer oder mehrerer nicht-katalytischer Einheiten (Module). Die Module sind oft durch eine flexible Verknüpfung getrennt und können unabhängig von einander funktionieren [7]. Jedes Modul kann entscheidend zur Effizienz der Enzymkatalyse beitragen. Viele der Multidomänenenzyme, die Polysaccharide hydrolysieren, besitzen nicht-katalysierende Domänen für die Bindung an Polysaccharide. Es wird behauptet, dass diese Bindungsfunktion durch Erhöhen der lokalen Enzymkonzentration an der Substratoberfläche die Affinität des Enzyms für das Polysaccharid ansteigen lässt [8, 9, 10]. Die Zellulose bindenden Domänen (cellulose binding domains - CBDs) wurden als die ersten Polysaccharid bindenden Domänen (PBDs) identifiziert und

ausführlich studiert. Die CBDs wurden aufgrund der Sequenzähnlichkeit in 10 Familien eingeteilt [8]. Viele PBDs mit unterschiedlicher Ligandbindungsspezifität wurden seit dieser Klassifizierung charakterisiert. Eine erweiterte Spezifität der PBDs wird durch Boraston et al. beschrieben, welcher den Begriff Kohlenhydrat bindende Module (*carbohydrate binding module* – CBM) einführt [11].

1.1.2 Kohlenhydrat bindende Module

Ein nicht-katalytisches Kohlenhydrat bindendes Modul (CBM) ist eine Domäne innerhalb eines Kohlenhydrat spaltenden Enzyms. Die Tatsache, dass CBMs als Module innerhalb größerer Enzyme existieren, unterscheiden diese Kohlenhydrat bindenden Domänen von anderen nicht-katalytischen Zucker bindenden Proteinen, wie Lectine und Zucker transportierende Proteine. Die Kohlenhydrat bindenden Module sind mit ihren unterschiedlichen Spezifitäten der Ligandenbindung in 33 Familien eingeteilt, die auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz basieren und in der CAZY – *carbohydrate-active enzyme* Datenbank (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) zusammengefasst sind. Diese nicht-katalytischen Module sind in den Zellwandhydrolasen der Pflanzen zu finden. Mehrere dreidimensionale Strukturen von verschiedenen Kohlenhydrat bindenden Komponenten (CBMs) aus verschiedenen CBM-Familien wurden bestimmt. Sie zeigen, dass diese Elemente ausschließlich aus β -Strängen bestehen, welche zu einem typischen „jellyroll“-Motiv angeordnet sind [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19].

CBMs weisen gewöhnlich Furchen auf, in der die Ligandenbindung stattfindet [16, 19, 20, 21]. Es wurde herausgefunden, dass aromatische Aminosäuren in den Bindungsfurchen eine wichtige Rolle in der Ligandenbindung spielen [22, 23, 24]. Die Orientierung dieser aromatischen Seitenketten bestimmt die Spezifität für den Liganden. Das gilt sowohl innerhalb einer Familie als auch zwischen den einzelnen Familien. CBMs der Familien 4, 16, 17, 22 und 27 wurden zu einer CBM-Superfamilie zusammengefasst [25]. Diese Verwandtschaft wurde auf der Grundlage der Aminosäuresequenzähnlichkeit und zweier konservierter Motive am N- und C-Terminus definiert. Die Identität in der Aminosäuresequenz zwischen den Vertretern der CBM Familien 4, 16, 17 und 22 ist niedriger als 25% (paarweise betrachtet) und deshalb zu niedrig für ein sinnvolles Anpassen der Sequenz außerhalb der zwei konservierten Motive. Die Definition der Superfamilie wird durch die Existenz der zwei konservierten Motive gerechtfertigt.

Kürzlich wurden drei neue CBM-Familien beschrieben, deren Mitglieder lösliches Mannan binden können [25, 26, 27]. Für jede CBM-Familie wurde für mindestens ein Modul die Mannan bindende Eigenschaft experimentell gezeigt. CBM23-1, früher bezeichnet als Man26Abm, wurde als erstes Kohlenhydrat bindendes Modul mit Mannan bindender Funktion beschrieben [27]. Dieses Modul gehört zu der CBM-Familie 23 und ist mit einer modularen Mannanase (Man26) des Bakteriums *Cellulomonas fimi* assoziiert. CBM23-1 bindet selektiv lösliches Galactomannan, jedoch nicht unlösliche Mannane, Zellulose, Chitin oder Xylan. Mitglieder der CBM-Familie 19 enthalten zwei Kopien einer neuartigen Klasse von CBMs [26]. Die zwei Kohlenhydrat bindenden Module der Familie 29 und ihre unterschiedlich langen Formen (CBM29-1, CBM29-2 oder CBM29-1-2) binden primär Mannan und Zellulose, jedoch mit höchster Affinität das heterogene Polymere Glucomannan. Familie 27 ist die dritte Familie der CBMs, deren Mitglieder Spezifität zu Mannan und speziell zu Galactomannan zeigen [25] und mit thermostabilen katalytischen Modulen mit β -Mannanase, und β -Mannosidase Aktivität assoziiert sind.

1.1.3 Der katalytische Spaltmechanismus

Die enzymatische Hydrolyse der glykosidischen Bindungen findet mittels einer allgemeinen Säurekatalyse statt, die zwei entscheidende Komponenten benötigt: einen Proton-Donor und eine Base/ ein Nukleophil [28]. Glykosidhydrolasen hydrolysieren z.B. β -1,4-glykosidische Bindungen innerhalb der Hauptkette des Substrates entweder bei Inversion oder bei Retention der anomeren Konfiguration. Für jede Familie sind in der CAZY-Datenbank der katalytische Mechanismus (sofern bekannt) sowie die Aminosäurereste, die als Nukleophile/Basen und Proton-Donoren agieren, dokumentiert. Die invertierenden Enzyme wenden einen einfachen Ersatzmechanismus an, in dem während der Hydrolyse ein attackierendes nukleophiles Wassermolekül die Konfiguration am anomeren Zentrum des Substrates umkehrt (invertiert). Stattdessen wenden die retendierenden Enzyme einen Doppel-Ersatzmechanismus an, in dem das Enzym bei dem ersten Schritt (Glykosylierung) als katalytisches Nukleophil eine Aminosäurekarboxylgruppe zur Bildung eines kovalenten Glykosyl-Enzym-Zwischenprodukts nutzt und in dem zweiten Schritt (Deglykosylierung) eine weitere Aminosäurekarboxylgruppe und ein Wassermolekül als Säure-Basen-Katalysator und als Nukleophil dienen [29, 30] (Abbildung 1).

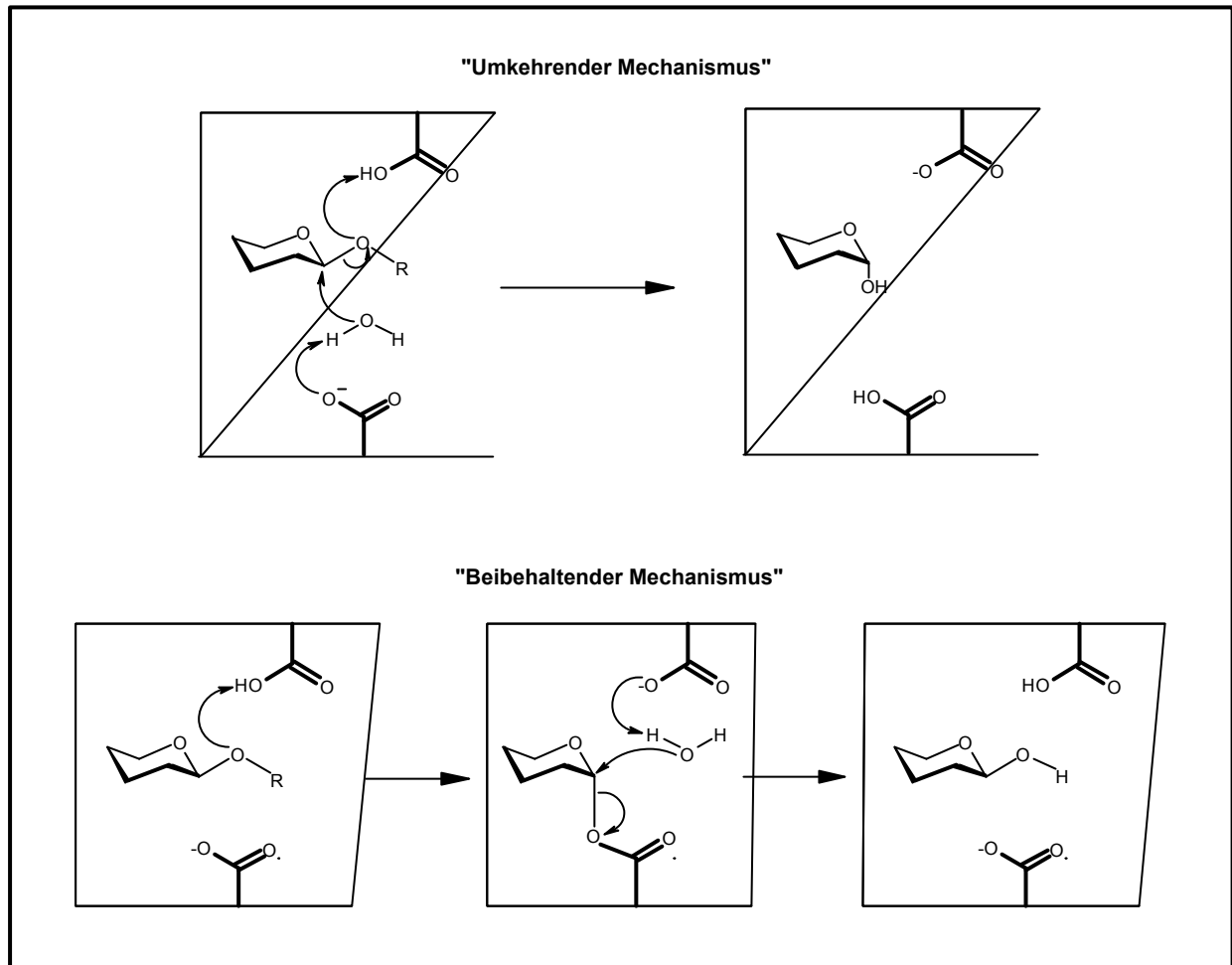


Abbildung 1: Mechanismen der enzymatischen Hydrolyse der glykosidischen Bindungen. Die Hydrolyse findet entweder bei „Umkehrung“ (Inversion) oder durch „Beibehaltung“ (Retention) der anomeren Konfiguration statt.

1.1.4 β -Mannanasen und β -Mannosidasen

Wie die β -Glucosidasen in dem Zellsystem sind die β -Mannosidasen für die komplette Hydrolyse der pflanzlichen Polysaccharide wie Galactomannan, Glucomannan und Mannan erforderlich. Sie wandeln die von β -Mannanasen produzierten Mannooligosaccharide zu Mannose um [31]. Es wurde herausgefunden, dass Mannanase unter anderem in Kombination mit α -Galactosidase den Abbau von Galactose in der Nadelholzaufbereitung verstärkt [32]. Für die komplette Hydrolyse der Mannane aus Nadelhölzern in einfache Zucker sind endo-1,4- β -Mannanasen (E.C 3.2.1.78, Mannan-endo-1,4- β -Mannosidase) und exoagierende β -Mannosidasen (E.C 3.2.1.25) erforderlich [26, 33]. Die β -Mannanasen werden von Pflanzen, anaeroben und aeroben Pilzen sowie von Bakterien produziert [34]. Neben den β -

Mannanasen und β -Mannosidasen sind weitere Enzyme wie die β -Glucosidasen (E.C 3.2.1.21), α -Galactosidasen (E.C 3.2.1.22) und Acetyl-Mannan-Esterasen erforderlich, um die Seitenketten der Zucker an den verschiedenen Stellen der Mannane zu entfernen. Eine Galactomannanstruktur, deren glykosidische Bindungen durch drei verschiedene Enzyme hydrolysiert wird, ist in der Abbildung 2, gezeigt.

Die β -1,4-Mannanasen (Endohydrolasen) schneiden willkürlich innerhalb der 1,4- β -D-Mannan Hauptkette von Galactomannan, Glucomannan, Galactoglucomannan und Mannan [35, 36] (Abbildung 2 und Abbildung 3). Die Hydrolyse dieser Polysaccharide wird durch das Ausmaß und das Muster des Ersatzes der Hauptkette durch α -D-Galactosylreste (Galactomannan und Galactoglucomannan) [37] und durch das Muster der Verteilung der D-Glucosylreste innerhalb der Hauptkette von Glucomannan und Galactoglucomannan beeinflusst. In Glucomannan könnte das Verteilungsmuster der O-Acetylgruppen die Empfindlichkeit der Polysaccharide gegenüber der Hydrolyse beeinflussen.

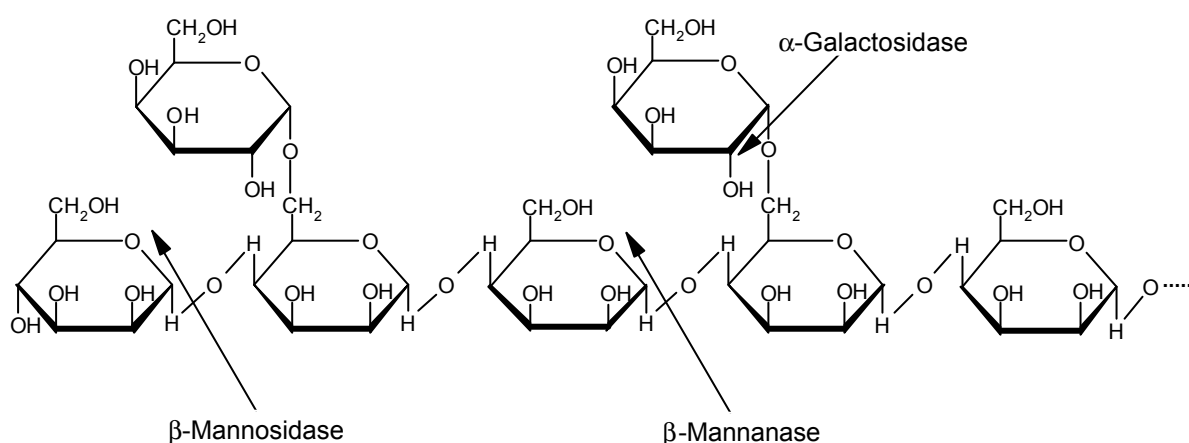


Abbildung 2: Schematische Galactomannan-Struktur. Das reduzierende Ende ist schematisch durch Punkte dargestellt. Die Polymannosekette (β -glycosidisch verbunden) ist an jedem zweiten Mannoserest mit einem Galactoserest verbunden (α -glycosidisch). Die Pfeile zeigen die glycosidischen Verbindungen, die durch β -Mannanase, β -Mannosidase und α -Galactosidase gespalten werden.

Die β -Mannanase des obligat anaerobischen und extrem thermophilen *Caldicellulosiruptor*-Bakterienstamms Rt8B.4, welcher eng mit *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* verwandt ist, ist ein Multidomänenenzym mit einer C-terminalen katalytischen β -Mannanase-Domäne, welche der Glycosidhydrolasefamilie 26 zugeordnet ist und daher als Mannanase 26 (früher ManA) bezeichnet wird. N-terminal befinden sich zwei unmittelbar hintereinander liegende

nicht-katalytische Substrat bindende Domänen, die der CBM-Familie 27 zugehörig sind (Abbildung 4, Seite 24). Die Mannan-bindende Funktion der CBM-Familie 27 wurde durch das C-terminale Kohlenhydrat bindende Modul aus der Mannanase 5 von *Thermotoga maritima* [38] und mit dem ersten N-terminalen Modul aus der β -Mannanase von *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4 [25] gezeigt. Die Mannanasen der Glycosidhydrolasefamilien 26 und 5 zählen zu den retendierenden Enzymen und spalten die glycosidischen Bindungen mittels eines Doppel-Ersatzmechanismus [29, 30]. Die Hauptprodukte, die durch die Hydrolyse von Mannan durch die β -Mannanasen entstehen, sind Mannobiose und Mannotriose. β -Mannanasen von *Aspergillus tamaritii* [39], *Trichoderma reesei* [40] und *Aspergillus giganteus* [31] produzieren hauptsächlich Mannobiose und Mannotriose oder Stränge längerer Oligosaccharide. Die hemicellulolytischen Enzyme finden in der papierherstellenden Industrie, in der Back- und Brauindustrie, sowie beim Aufbereiten von Fruchtsäften, Kaffee und Bohnen Anwendung.

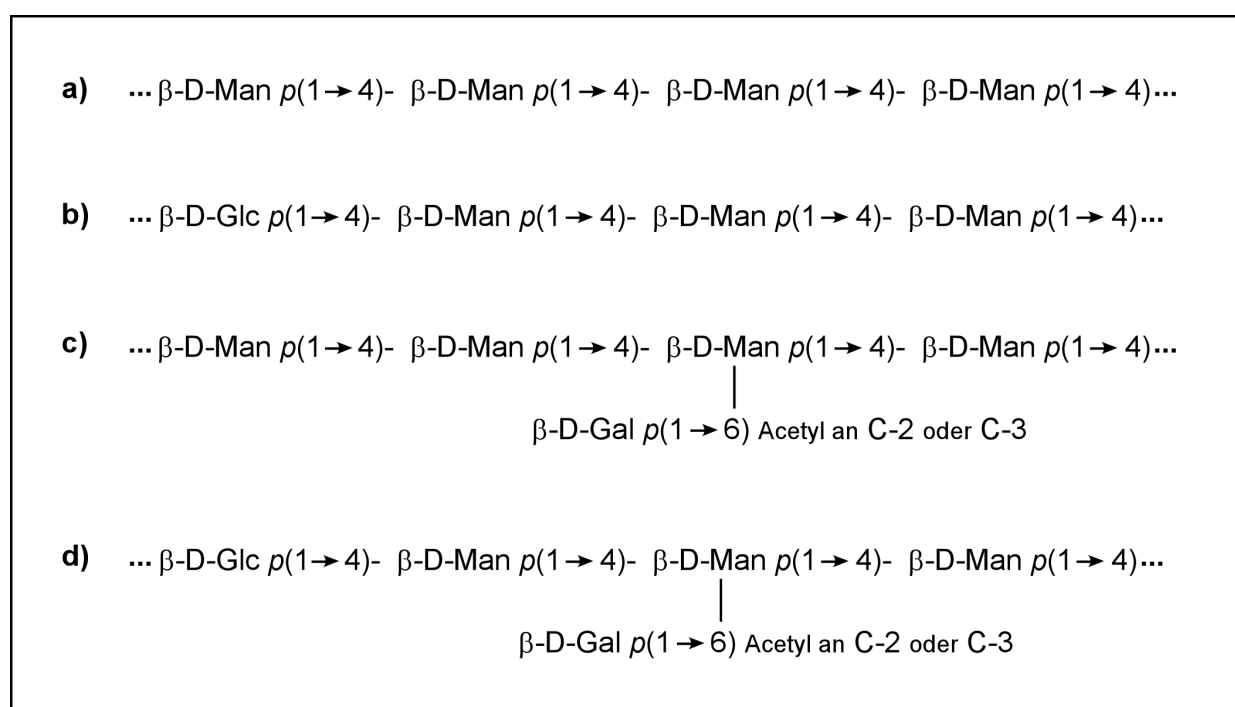


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturen eines typischen Mannans, Glucomannans, Galactomannans und Galactoglucomannans. Mannan (a) und Glucomannan (b) sind Polymere mit einem Rückgrat aus β -1,4-verbundenen Mannopyranoseeinheiten. In Glucomannan enthält die Hauptpolymerkette zusätzlich willkürlich verteilte Glucopyranoseeinheiten innerhalb des Moleküls. Eine Galactomannanstruktur (c) besitzt am β -1,4-verbundenen Mannopyranoserückgrat eine α -1,6-verbundene D-Galactose-Seitengruppe. Die Mannose- oder Glucoseeinheiten des Galactoglucomannanrückgrats (d) sind ebenfalls α -1,6-verbunden mit D-Galactose.

1.2 Das Substrat

1.2.1 Mannan

Die Familie der β -Mannane besteht aus einem Rückgrat von β -1,4-verbundenen Polymeren der Mannose und lässt sich in 4 Unterfamilien unterteilen, abhängig von der Präsenz oder dem Fehlen anderer Zucker in der Polymerkette [41]. Die Unterfamilien sind: (a) die reinen linearen Mannane, bestehend einzig aus Mannoseresten; (b) die Glucomannane, in denen ein bestimmter Prozentsatz an Mannoseeinheiten des linearen Mannanrückgrats durch β -1,4-verbundene Glucosereste ersetzt ist; (c) die Galactomannane und (d) die Galactoglucomannane, in denen eine Anzahl von Galactoseresten jeweils in der linearen Mannan- oder Glucomannanpolymerkette integriert sind. Mannan enthaltende Polysaccharide sind eine Hauptkomponente der Hemicellulosefraktion in Nadelhölzern und Laubhölzern sowie in dem Endosperm vieler Samen von Hülsenfrüchten und in einigen Samen nicht-hülsenfruchtartiger Pflanzen. Hemicellulosen sind gewöhnlich zusammen mit Cellulose und Lignin in pflanzlichen Zellwänden zu finden und packen dicht zu lang gestreckten Molekülen aneinander. Sie erhalten damit die Form und die Stabilität der Pflanze und schützen die Zellwand [42, 43]. Mannane aus Laubhölzern bestehen aus β -1,4-verbundener Mannopyranose- und Glucopyranoseeinheiten, während Nadelhölzer zwei verschiedene Arten von acetylierten Galactoglucomannanen enthalten. Diese bestehen aus Glucose, Mannose und Galactose in einem Verhältnis 1:3:1 und 1:4:0.1 entsprechend. β -1,4-Mannan der nicht-hülsenfruchtartigen Pflanzen ähnelt den Cellulosen im Aufbau der individuellen Polysaccharidketten und ist wasserunlöslich. Lösliches Galactomannan ist in den Samen von Hülsenfrüchten der Hauptkohlenhydratspeicher, der 20% des gesamten Trockengewichts ausmacht [44]. Außerdem ist β -Mannan eine wichtige strukturelle Komponente einiger Meeresalgen [45, 46] und terrestrischer Pflanzen, wie die Elfenbein- bzw. Steinnuss [47] und Kaffeebohnen [48].

1.3 Anwendung von Enzymen extremophiler Organismen

Thermophile Bakterien, isoliert aus geothermalen Quellen oder anderen heißen Umgebungen, produzieren denaturierungsresistente Enzyme, welche erst bei hohen Temperaturen über 60 °C eine vergleichbare Aktivität zeigen zu Enzymen aus mesophilen Organismen. Verschiedene solcher Enzyme sind unabdingbar in industriellen Prozessen, z.B. in der Zellstoff- und Papierindustrie. Diese Anwendung wird hier kurz beschrieben, da dies ein Haupteinsatzgebiet der denaturierungsresistenten Enzyme ist. Bei der Zellstoff- und Papier-

herstellung werden die Holzfasern in alkalischen Lösungen gekocht, um den Hauptanteil an Lignin von 95% zu entfernen. Die dunkelbraune Färbung des Zellstoffs wird durch den restlichen Anteil an Lignin verursacht und verstärkt sich unter Lichteinstrahlung durch Oxidation. Diese braune Färbung kann durch vielfache chemische Bleichungsprozesse entfernt werden, um weißen Zellstoff für hoch qualitatives Papier zu erhalten, wobei jedoch ökologisch bedenkliche Nebenprodukte entstehen. Um Lignin aus den Holzfasern zu entfernen, wurden aus ökologischem Interesse zusätzlich Enzyme verwendet, bei denen keine schädlichen chemischen Nebenprodukte entstehen [49]. Die Menge an bleichenden Chemikalien, wie Chlor oder Chlordioxid, wird durch vorheriges Behandeln der Holzfasern mit Enzymen reduziert [50, 51]. Xylanasen wurden anfangs für den Bleichungsprozess als enzymatische Hilfe genommen, jedoch zeigte es sich, dass Mannanasen eine sehr ähnliche Funktion erfüllten [52]. Von dem extrem thermophilen Bakterienstamm *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4 wurde eine β -Mannanase isoliert, die eine hohe Enzymaktivität zeigt bei Temperaturen und pH-Werten, die auch bei dem Holzaufschlussprozess im Vorbleichstadium der Zellstoff- und Papierherstellung vorliegen [[53].

In dieser Studie wird die Bestimmung der Kristallstruktur des ersten N-terminalen Kohlenhydrat-bindenden Moduls der CBM-Familie 27 (CsCBM27-1) in nativer und Mannoheptaose-gebundener Form beschrieben. Dieses Modul ist Teil der Mannanase 26 aus *Caldicellulosiruptor*, Stamm Rt8B.4 (Abbildung 4).

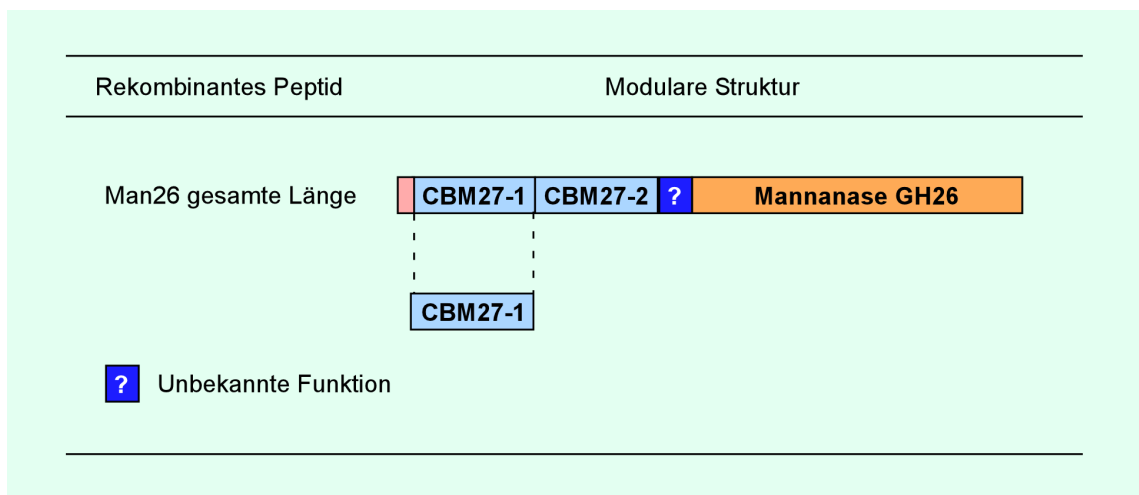


Abbildung 4: Modulare Struktur der β -Mannanase GH26 aus *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4. Am N-terminalen Ende befinden sich zwei Kohlenhydrat bindende Module (carbohydrate-binding modules – CBM) und am C-terminalen Ende die katalytische Glycosidhydrolase-Domäne. Die Struktur und die Funktion der Peptidkette zwischen diesen Bereichen ist bisher unbekannt.

Zusammen mit Daten isothermer Titrationskalorimetrie sollte die strukturelle und thermodynamische Basis der Erkennung von Mannooligosacchariden durch die CBMs der Familie 27 analysiert werden. Obwohl es eine Vielzahl von CBM-Strukturen bereits gibt, haben diese aber geringe sequenzielle Ähnlichkeit zueinander (oft nicht höher als 30%). Deshalb wurde die Strukturbestimmung von CsCBM27-1 einschließlich der Phasenbestimmung durch Schweratomderivate geplant und durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Klonierung, Expression und Proteinreinigung

2.1.1 Natives Protein CsCBM27-1

Das gereinigte Protein CsCBM27-1 wurde von dem Kooperationspartner Dr. Anwar Sunna aus der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Robert Seckler in dem Labor für Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, Golm, zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des rekombinanten Plasmids *CsCBM27-1:pPROEX HTc* ist von Sunna et al., 2001 [25] im Detail beschrieben. Der Expressionsvektor pPROEX HTc (Invitrogen Life Technologies) kodiert für eine N-terminale Sequenz, die aus sechs Histidinresten (His_6 tag) besteht, und enthält unmittelbar darauf eine Proteaseschnittstelle.

Für die Produktion des nativen Proteins wurde 3 x 1 Liter Luria Bertani Medium mit dem *Escherichia coli* Stamm DH5 α , der das rekombinante Plasmid *CsCBM27-1:pPROEX HTc* enthält, angeimpft. Das selektive Antibiotikum Ampicillin wurde mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ dem Medium zugegeben. Die Schüttelkulturen wurden bei 32 °C inkubiert, bis eine optische Zelldichte von 0,8 bei einer UV-Absorption von 600 nm für die anschließende Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG erreicht wurde. Die Zellen wurden weiter bei 28 °C über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in Puffer A (50 mM Phosphatpuffer pH 8,0; 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert und durch zweimaliges Durchlaufen der French-Press aufgeschlossen. 1 mM des Serin-Proteaseinhibitors Pefablock SC (Roche) wurde dem Zellextrakt zugegeben und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 40000 g und 4 °C entfernt. CsCBM27-1 wurde als erstes von dem geklärten Zellextrakt durch Ni-NTA-Chromatographie entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt. Der Extrakt wurde auf eine Chelatsepharose-„fast-flow“-Säule (Amersham Biosciences) gegeben, welche vorher in Puffer A mit 150 mM Imidazol equilibriert wurde. CsCBM27-1 wurde mit einem linearen Gradienten von 150 – 300 mM Imidazol in Puffer A eluiert. Die Fraktionen, die

CsCBM27-2 enthielten, wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) [54] und Färbung mit *Coomassie Blue* identifiziert, vereinigt und durch Verwendung einer Amicon Ultrafiltrationszelle mit einer Millipore YM Membran (10 kDa Porengröße) konzentriert. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde durch die UV Absorption bei 280 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient von $36900 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ wurde von dem Programm ProtParam für CsCBM27-1 nach der Methode von Gill und von Hippel [55] abgeschätzt, welche die Extinktionskoeffizienten der Seitenketten von Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Cystein bei einer bestimmten Wellenlänge entsprechend der Häufigkeit addiert. Konzentriertes CsCBM27-1 wurde gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85°C gelagert. Vor dem Kristallisieren des nativen Proteins wurde es portionsweise auf Eis aufgetaut und der N-terminale His₆-tag durch Inkubation mit der rTEV-Protease entsprechend der Herstellerangaben (Invitrogen Life Technologies) entfernt. Die Abtrennung des His₆-tag freien Proteins von der rTEV-Protease und des abgespaltenen His₆-tags, sowie Konzentrierung, Dialyse und Überprüfung der Reinheit des Proteins erfolgte wie unter 2.1.2 beschrieben. Zur Konzentrationsbestimmung des His₆-tag freien Proteins wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $31780 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ verwendet.

2.1.2 Selenomethionin substituiertes Protein CsCBM27-1

Für die Produktion von Selenomethionin enthaltendem CsCBM27-1 hat der Kooperationspartner Dr. Anwar Sunna das Plasmid pPROEX FTc mit dem CBM27-1-Konstrukt in Methionin-auxotrophe *E. coli* B834 (DE3) Zellen transformiert. Diese Zellen wurden in New Minimal Medium (NMM), wie in Budisa et al. beschrieben [56], angezogen. Zwei 30 ml Kulturen wurden über Nacht bei 30°C in NMM (ergänzt mit M9-Salzen, allen regulären Aminosäuren (40 mg/l) außer Methionin, Thiamin und Biotin (10 mg/l), 20 mM Glucose, 1 mg/l von FeSO₄ und CaCl₂, 1 µg/l von MnCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, Na₂MoO₄) mit einer Mixtur aus 0,9 mg/l 80 %iger Seleno-L-Methionin und 20 %iger L-Methionin-Lösung und 100 µg/ml Ampicillin angezogen. Die Zellen der Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (wie in 2.1.1 beschrieben) geerntet, mit 20 ml NMM gewaschen, wieder zentrifugiert und in 20 ml NMM resuspendiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von 2 Liter NMM mit Zusatz von 0,9 mg/l Seleno-L-Methionin und 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Induktion, Zellernte und Reinigung verliefen analog dem Protokoll für das native Protein, siehe Abschnitt 2.1.1, mit

der Ausnahme, dass 5 mM β -Mercaptoethanol zu den Chromatographiepuffern und 5 mM DTT zum Dialysepuffer zugegeben wurden.

Für die Kristallisation wurde der N-terminale His₆-tag durch Inkubation mit der rTEV-Protease entsprechend der Herstellerangaben (Invitrogen Life Technologies) entfernt. CsCBM27-1 wurde vom abgespaltenen His₆-tag durch Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie getrennt. Das ungebundene CsCBM27-1 wurde mittels eines 5 kDa *cut-off* Biomax-Zentrifugalkonzentrator (Millipore) eingeeengt und gegen 20mM Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. Die Reinheit des Proteins wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft [57]. Für die Konzentrationsbestimmung des gereinigten CsCBM27-1 ohne His₆-tag wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 31780 (M·cm)⁻¹ verwendet.

2.2 Bindungsstudien von Mannooligosacchariden an CsCBM27-1

Substratbindungsstudien mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Wolfgang Pfeil aus dem Labor für Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, Golm, durchgeführt. Die Vorgehensweise des Experiments war ähnlich der in Baxa et al. beschriebenen Studie [58]. Die Konzentration des CsCBM27-1 in der Rührzelle lag zwischen 2 und 15 μ M und die eingesetzten Mannoseoligosaccharidkonzentrationen lagen zwischen 50 μ M und 300 μ M (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Bei der Einwaage der Mannooligosaccharide und Resuspension in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) wurde auf höchste Genauigkeit geachtet. Geringe Hitzeänderung, die in den Kontrollmessungen der Mannooligosaccharide gegen Puffer auftrat, wurde entsprechend in den Titrationsdaten korrigiert. Die Daten wurden auf ein *single-binding site* Modell gefittet (Origin version 5.0, MicroCal Inc.).

ITC-Experimente unter Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an EDTA wurden mit CsCBM27-1 durchgeführt, welches gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert wurde.

2.3 Kristallographische Methoden

2.3.1 Kristallisation und Kryoprotektion

Die Kristallisation von CsCBM27-1 in Komplex mit Mannohehexaose und des Substrat-freien CsCBM27-1 erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. Anwar Sunna.

2.3.1.1 CsCBM27-1 in Komplex mit Mannohehexaose

Gereinigtes Selenomethionin-substituiertes CsCBM27-1 wurde mit Mannohehexaose im Verhältnis 1: 20 gemischt. Diese Lösung wurde für die Kristallisation nach der *hanging-drop* Methode eingesetzt. Hierfür wurde ein 1,5 µl Tropfen Protein-Mannohehexaose Mixtur und 1,5 µl Reservoirlösung gemischt und auf ein silikonisiertes Deckgläschen pipettiert. Das Deckgläschen wurde umgedreht luftdicht auf ein Reservoir mit 500 µl kommerziell erhältlicher Hampton-Screenlösung aufgebracht [59]. Über die Dampfphase (*vapor diffusion*) stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Reservoir und hängendem Tropfen ein (Raoult-sches Gesetz). Der Wasserentzug im Kristallisationstropfen führt zur Konzentrierung des Proteins und anderer nicht flüchtigen Komponenten (Salze). Nach Überwinden der Löslichkeitsgrenze fällt das Protein kristallin (Kristallwachstum) oder als amorphes Präzipitat aus. Zur Kristallisation wurden kommerziell erhältliche Kristallisationslösungen von Hampton Research Corp., Laguna Niguel, USA eingesetzt. Orthorhombische Kristalle wuchsen innerhalb von 2 bis 3 Tagen nach Temperaturerhöhung der Kristallansätze von 4°C auf 10°C im Hampton-Screen I, Bedingung 41 [59]. Durch Variation dieser Bedingung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Protein (2,65 – 5,0 mg/ml) und Zucker (5,6 – 7,5 mM) konnten weitere Kristalle unterschiedlicher Größe mit gleicher Morphologie erzeugt werden. Diese Kristalle wurden aufgrund der bereits gegebenen Kryobedingung (10% v/v 2-Propanol; 20% w/v PEG 4000; 0,1 M Hepes-Na pH 7,5), direkt mit einer Nylonschlinge mit ~ 200 µm Durchmesser aus dem Kristallisationstropfen gefischt und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren.

2.3.1.2 Natives Protein CsCBM27-1 ohne Substrat

Substrat freies natives Protein CsCBM27-1 wurde nach der in 2.3.1.1 beschriebenen *hanging-drop* Methode kristallisiert. Die Kristallisation und Einfrierprozedur verlief wie für das Zucker-gebundene Protein. Allerdings zeigten die bei Hampton Screen I, Bedingung 41 [59], gewachsenen Kristalle tetragonale Morphologie im Gegensatz zu den Kristallen des CsCBM27-1/Mannohehexaose Komplexes.

2.3.2 Sammlung von Röntgendiffraktionsdaten

Die Kristalle wurden auf Diffraktionsqualität in der Arbeitsgruppe am MDC, an einem Rigaku-Generator RU H2B mit $3 \times 0,3$ mm Fokus mit Kupfer-Drehanode und einer MAR345-*Image-Plate* (MARResearch, Nordersted) mit MaxFlux System getestet. Für die Testmessungen wurde die Nylonschlinge mit dem Kristall in einen laminaren Stickstoffstrom (110 Kelvin) positioniert, da die Datensammlung unter Kryobedingungen die Datenqualität, aufgrund geringer Strahlenschäden am Kristall und einem geringem Signal/Rauschverhältnis verbessert.

Von allen Kristallen wurden Datensätze an der Strahlenquelle ID14-2 der Proteinstrukturfabrik (PSF) bei BESSY in Berlin-Adlershof gemessen. Der Messplatz ist mit einem MAR345 *Image-plate* System zur Aufnahme der Diffraktionsdaten ausgestattet. Für die Selenomethionin substituierten Kristalle wurde zuvor ein Fluoreszenzspektrum an der theoretischen Röntgenabsorptionskante für Selen aufgenommen, um die genaue Energie des Absorptionsmaximums zu bestimmen. An der *Peak*-Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Selen) von $0,9795 \text{ \AA}$ wurden von einem SeMet-CBM27-1 Kristall 180 Diffraktionsbilder mit $\Delta\varphi = 1^\circ$ bis zu einer maximalen Auflösung von $1,86 \text{ \AA}$ aufgenommen. Es wurde hier nicht nur auf Vollständigkeit des Datensatzes geachtet, sondern auch auf Redundanz (mittlere Häufigkeit mit der jeder Reflex gemessen wird). Des Weiteren wurde von einem anderen SeMet – CBM27-1 Kristall ein Datensatz bei $\lambda = 0,9798 \text{ \AA}$ mit „niedriger“ Auflösung bis $1,93 \text{ \AA}$ und ein weiterer mit sehr hoher Auflösung bis $1,06 \text{ \AA}$ gemessen.

Von den CsCBM27-1 Kristallen ohne Substrat wurde ein vollständiger nativer Datensatz bei einer Wellenlänge $\lambda = 0,976 \text{ \AA}$ bis zu einer maximalen Auflösung von $1,55 \text{ \AA}$ aufgenommen.

Die Datensätze des bis $1,06 \text{ \AA}$ streuenden Kristalls wurden mit dem XDS-Programmpaket indiziert, prozessiert und zusammenskaliert [60, 61]. Alle weiteren Datensätze wurden mit dem Programmpaket DENZO/SCALEPACK ausgewertet [60, 61]. Die Raumgruppen wurden auf Grund der Lauesymmetrie und der systematisch abwesenden Reflexe bestimmt.

2.3.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung

2.3.3.1 SAD-Daten des CsCBM27-1/Mannohexaose-Komplexes

Die Phasenbestimmung erfolgte durch die *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) Methode [62] mit dem Programm SOLVE [63] und wurde durch die in RESOLVE angewendete *maximum-likelihood* Dichtemodifikationsmethode verbessert [64]. In die resultierende

Elektronendichte wurden durch automatischen Modellbau in RESOLVE eine hohe Anzahl Aminosäurereste eingebaut. Weiterer Modellbau erfolgte manuell im Programm ONO [65]. Vor der Strukturverfeinerung wurden 5% der Reflexe über den gesamten Auflösungsbereich selektiert und zur Vergleichsprüfung des Verfeinerungsprozesses für die Berechnung des R-Faktors R_{free} eingesetzt [66]. Der CsCBM27-1/Mannohexaose-Komplex wurde durch wechselnde Zyklen von Molekülbau mit ONO und Verfeinerung mit individuellen isotropischen B -Faktoren und stereochemischen Randbedingungen (restraints) nach Engh und Huber [67] gegen experimentelle Phasen mit dem Programm REFMAC [68] vervollständigt und verfeinert. Im nächsten Schritt wurden der hoch- und niedrigaufgelöste SeMet-Datensatz mit dem CCP4-Programm CAD [69] kombiniert, wobei die für die Berechnung von R_{free} eingesetzten Reflexe beibehalten und auf die höhere Auflösung von 1,06 Å erweitert wurden. Anschließend wurde das bisher verfeinerte Modell gegen diesen Datensatz weiter verfeinert. Erst in den letzten Verfeinerungszyklen wurde zu einer Verfeinerung mit individuellen anisotropen B -Faktoren übergegangen. Wassermoleküle wurden automatisch mit dem ARP-wARP/REFMAC-Programm platziert und visuell auf Bindungspartner im Abstand von 2.5 Å bis 3.5 Å überprüft [70].

2.3.3.2 Natives CsCBM27-1 ohne Substrat

Die Struktur des substratfreien nativen Proteins CsCBM27-1 wurde mit dem Datensatz im Auflösungsbereich von 24,6 – 2,0 Å und der „Methode des molekularen Ersatzes“ unter Anwendung des Programms AMORE [71] bestimmt. Als Modell wurde die CsCBM27-1/Mannohexaose Komplexstruktur (PDB ID Code: 1PMH) ohne Substrat verwendet. Nachdem die Rotationsmatrix und der Translationsvektor bestimmt und angewendet wurden, wurde das Modell mehreren Modellbau- und „*maximum likelihood*“ Verfeinerungsrunden (isotrop) mit den Programmen ONO [65] und REFMAC [68] unterworfen. Zur Strukturverfeinerung wurden 7% aller Reflexe zur Vergleichsprüfung des Verfeinerungsprozesses für die Berechnung des R-Faktors R_{free} eingesetzt [66]. Nachdem das gesamte Molekül vollständig verfeinert war, wurde zu einer Verfeinerung mit individuellen anisotropen B -Faktoren der gesamte Auflösungsbereich von 24,6 – 1,55 Å herangezogen und alle Wassermoleküle mit dem Programm ARP-wARP [70] positioniert und visuell überprüft.

2.4 Nachweis der Seleneinlagerung

Der Nachweis der Substitution von Selenomethionin in dem CsCBM27-1 Protein erfolgte mittels Massenspektrometrie. Dazu wurde ein Protein/Substrat-Kristall in TFA-Wasser aufgelöst, das Protein tryptisch verdaut und die entstandenen Fragmente untersucht. Die Messungen wurden von Dr. Eva-Christina Müller, MDC, Berlin durchgeführt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Proteinexpression und Reinigung

Das native sowie das Selenomethionin-eingelagerte CsCBM27-1 wurde von dem Kooperationspartner Dr. Anwar Sunna aus der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Robert Seckler in dem Labor für Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, Golm rekombinant hergestellt und zu guter Qualität gereinigt (Daten nicht gezeigt). Zur Kristallisation standen gereinigtes, natives und Selenomethionin-modifiziertes Protein mit entsprechenden Konzentrationen von 8,55 mg/ml und 8 mg/ml zur Verfügung.

3.2 Mannooligosaccharid-Bindung an CsCBM27-1

Um für die Kristallisation und Strukturaufklärung von CsCBM27-1 im Komplex mit einem Mannooligosaccharid den optimalen Bindungspartner zu bestimmen, wurden von dem Kooperationspartner Dr. Wolfgang Pfeil Experimente zur Quantifizierung der Affinität von CsCBM27-1 für lösliche Mannooligosaccharide mit Hilfe der isothermen Titrationskolorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) durchgeführt. Es zeigte sich, dass CsCBM27-1 zu Mannooligosacchariden mit einem Polymerisationsgrad von 3 und höher eine Bindung einging. Die geringste Affinität wurde für die Mannotriose mit einer Assoziationskonstante $K_a = 0,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ und die höchste Affinität für die Mannohexaose mit $K_a = 100 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ beobachtet (Tabelle 1). Affinitätsquantifizierung mit Mannooligosacchariden höherer Polymerisationsgrade als 6 konnte auf Grund deren Unlöslichkeit laut Hersteller (Megazyme, Bray, Irland) nicht durchgeführt werden. Diese Bindung ist ungefähr 150 – 500 fach höher als die Affinitäten, die für die Interaktion zwischen löslichen Oligosacchariden und CBMs mesophiler Herkunft berichtet wurden [13, 14, 72, 73]. Die Bindungsstöchiometrien der getesteten Mannooligosaccharide an CsCBM27-1 lagen abzüglich des experimentellen Fehlers bei 1:1,

welches einer Bindung von einem Ligand an ein CsCBM27-1 Molekül entspricht. Bei einer Temperatur von 25 °C wurden für die Bindung aller Oligosaccharide an CsCBM27-1 negative Werte für ΔS und ΔH beobachtet, was auf Enthalpie-getriebene Reaktion mit teilweiser Kompensierung durch entropische Beiträge hindeutet. Dies ist eine typische Beobachtung für Wechselwirkungen löslicher Zucker mit CBM [13, 16, 24, 74, 75], die nahezu immer enthalpisch angetrieben sind und hauptsächlich von polaren Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen herrühren. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass entropische Beiträge einen wichtigen Beitrag für die Bindung der CBMs an unlösliche Zucker leisten [76]. Diese sind hauptsächlich auf die Unterschiede in den hydrophoben Wechselwirkungen und der Mobilität zurückzuführen.

Tabelle 1: Thermodynamische Werte der Bindung von CsCBM27-1 an Mannooligosaccharide

Ligand	K_a [$\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$]	DG [kJ mol ⁻¹]	DH [kJ mol ⁻¹]	DS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	n ^a
Mannotriose^b	0.02	-24.8	-39.9	-50.62	0.92
Mannotetraose	0.56 ± 0.04	-32.8 ± 0.2	-60.7 ± 1.3	-93.6 ± 4.9	0.83
Mannopentaose	4.65 ± 0.02	-38.0 ± 0.1	-66.5 ± 1.5	-91.5 ± 5.4	0.81
Mannohexaose	10.0 ± 0.01	-39.9 ± 0.2	-67.6 ± 3.5	-92.8 ± 12.6	0.98

Die Fehler zeigen Standardabweichungen aller drei Experimente. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0.

^a Stöchiometrie der Interaktion [mol Ligand / mol CsCBM27-1].

^b Daten von einem Experiment.

3.3 Kristallisation

3.3.1 CsCBM27-1 / Mannohexaose-Komplex

Mannohexaose zeigte in den ITC Experimenten die höchste Bindungskonstante. Deshalb wurde von Mannohexaose ein Komplex mit SeMet-CsCBM27-1 für die Kristallstrukturanalyse ausgewählt. Vier Kristalle mit einer Größe zwischen 50×50×100 µm bis 75×100×200 µm wurden nach systematischer Durchmusterung von Kristallisationsbedingungen erhalten. Nach Optimierung der Kristalle durch Variation der Protein- und Substratkonzentration

konnten Kristalle mit Abmessungen von $75 \times 150 \times 220 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Bei Diffraktionsexperimenten stellte sich heraus, dass 10 -12% aller rund 50 getesteten Kristalle Röntgendaten mit einer Auflösung von unter 2 \AA produzierten. Die Diffraktionsqualität korrelierte stark mit der Größe und der Morphologie der Kristalle. Je größer die Kristalle und besser ihre Morphologie (glatte Kristallkanten und -flächen) war, desto höher war die Auflösung des Diffraktionsmusters und desto klarer waren auch die Reflexe (kein Ausschmieren). Letztendlich wurden von zwei Kristallen Datensätze aufgenommen, die für die Strukturanalyse verwendet wurden. Ein etwas kleinerer Kristall mit guten Diffraktionseigenschaften wurde für die SAD-Datensammlung verwendet und ein sehr schöner, großer Kristall für die Sammlung hoch aufgelöster Daten (Abbildung 5). Sie sind bei einer Protein-/Substratkonzentration im Tropfen von $4,27 \text{ mg/ml}$ Protein und $5,6 \text{ mM}$ Mannohexaose gewachsen, welches einem molaren Verhältnis von 1:27,5 entspricht.

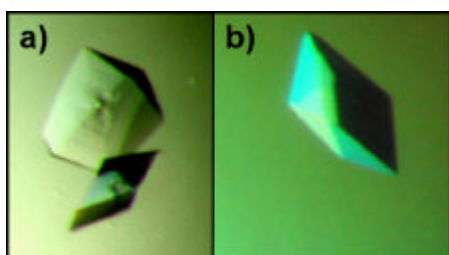


Abbildung 5: SeMet-CsCBM27-1/Mannohexaose-Kristalle. a) Zwei Kristalle, von denen der untere mit der Größe $75 \times 110 \times 180 \mu\text{m}$ für die SAD-Datensammlung verwendet wurde. b) Kristall mit Abmessungen von $100 \times 150 \times 250 \mu\text{m}$, der für die Sammlung der hoch aufgelösten Daten eingesetzt wurde.

3.3.2 Natives Protein CsCBM27-1

Aus der Kristallisation von nativem, Zucker-freiem CsCBM27-1 resultierten kleinere Kristalle als von dem Protein-Substrat-Komplex (siehe Kapitel 3.3.1) mit unklarer Morphologie. Hier war es weitaus schwieriger, ausreichend gut streuende Kristalle zu finden, da diese eine Tendenz zu Verwachsungen zeigten (Abbildung 6a). Aus der Reproduktion der Kristallisationsbedingung, beschrieben in Kapitel 2.3.1.2, mit Variation der Proteinkonzentration ($2,67 - 10,69 \text{ mg/ml}$), konnten nur kleine unverwachsene Kristalle erhalten werden (Abbildung 6b). Trotz der limitierten Größe zeigten einzelne Kristalle gutes Streuverhalten bei ersten Testmessungen am Messplatz der Arbeitsgruppe. Von dem am besten streuenden Kristall wurde ein nativer Datensatz bis $1,55 \text{ \AA}$ am Messplatz ID14-2 bei BESSY aufgenommen.

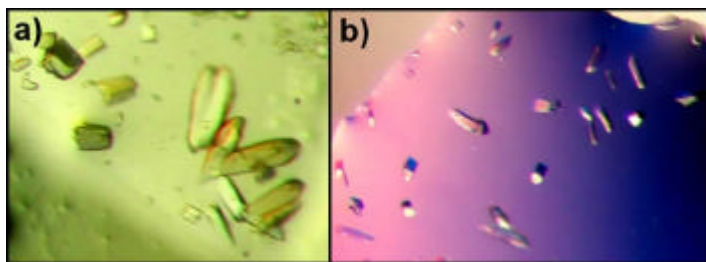


Abbildung 6: Kristalle von nativem CsCBM27-1. a) Verwachsene Kristalle mit einer Größe von rund 50×50×100 µm. b) Einzelne tetragonale Kristalle mit Abmessungen von rund 75×75×120 µm.

3.4 Feststellen der Seleneinlagerung

Nach dem tryptischen Verdau des Proteins SeMet-CsCBM27-1 wurde von der Peptidmischung ein Massenspektrum aufgenommen (Abbildung 8a). Die Peaks des Selenomethionin (SeMet) enthaltenden Peptids S^{83} -V-E-F-E-M^{Se}-F-I-P-Y-D-E-F-S-K⁹⁷ und des gleichen Peptids, jedoch ohne Seleneinlagerung, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Vom SeMet-Peptid wurde ein Fragmentationsspektrum erfasst, um eindeutig die Seleneinlagerung anhand der Fragmentionen zu bestätigen (Abbildung 8b). Die Differenz zwischen den Fragmentionen SeMFIPYDEFSK (1324.51 Da) und FIPYDEFSK (1145.55 Da) beträgt 179 Da und entspricht dem Molekulargewicht von Selenomethionin. Das Auftreten des Peaks ohne Selen (Abbildung 8a) mit einer Intensität von ~ 25 % zeigt, dass die Selen-Einlagerung nicht vollständig erfolgte.

Das Peptid mit dem zweiten, laut Sequenz (Abbildung 7) enthaltenem Methionin bzw Selenomethionin (Aminosäure 17), konnte nicht detektiert werden. Eine mögliche Ursache könnte die sehr starke Verdünnung der Probe sein, welche notwendig war, da noch in der Probe störende Detergenzien vorlagen die Probleme verursachten. Generell hängt es auch sehr stark von der Aminosäurezusammensetzung der Peptide ab, ob sie detektiert werden können. Man kann jedoch davon ausgehen, wenn in einem Peptid Selenomethionin von den Zellen eingebaut wurde, dann ist dies auch der Fall für das andere Peptid.

```

1  ESSVNPVVLD FEDGTVMSFG EAWGDSLKCI KKVSVSQDLQ RPGNKYALRL
51 DVEFNPNGW DQGD LGTWIG GVVEGQFDFT GYKSVEFEMF IPYDEFSKSQ
101 GGFAYKVVIN DGWKE LGSEF NITANAGKKV KINGKDYTVI HKAFALPEDF
151 RTKKRAQLVF QFAGQNSNYK GPIYLDNVRI RPEDA
  
```

Abbildung 7: Aminosäuresequenz des nativen CsCBM27-1. In der Sequenz enthaltene Methionine sind in roten Buchstaben hervorgehoben.

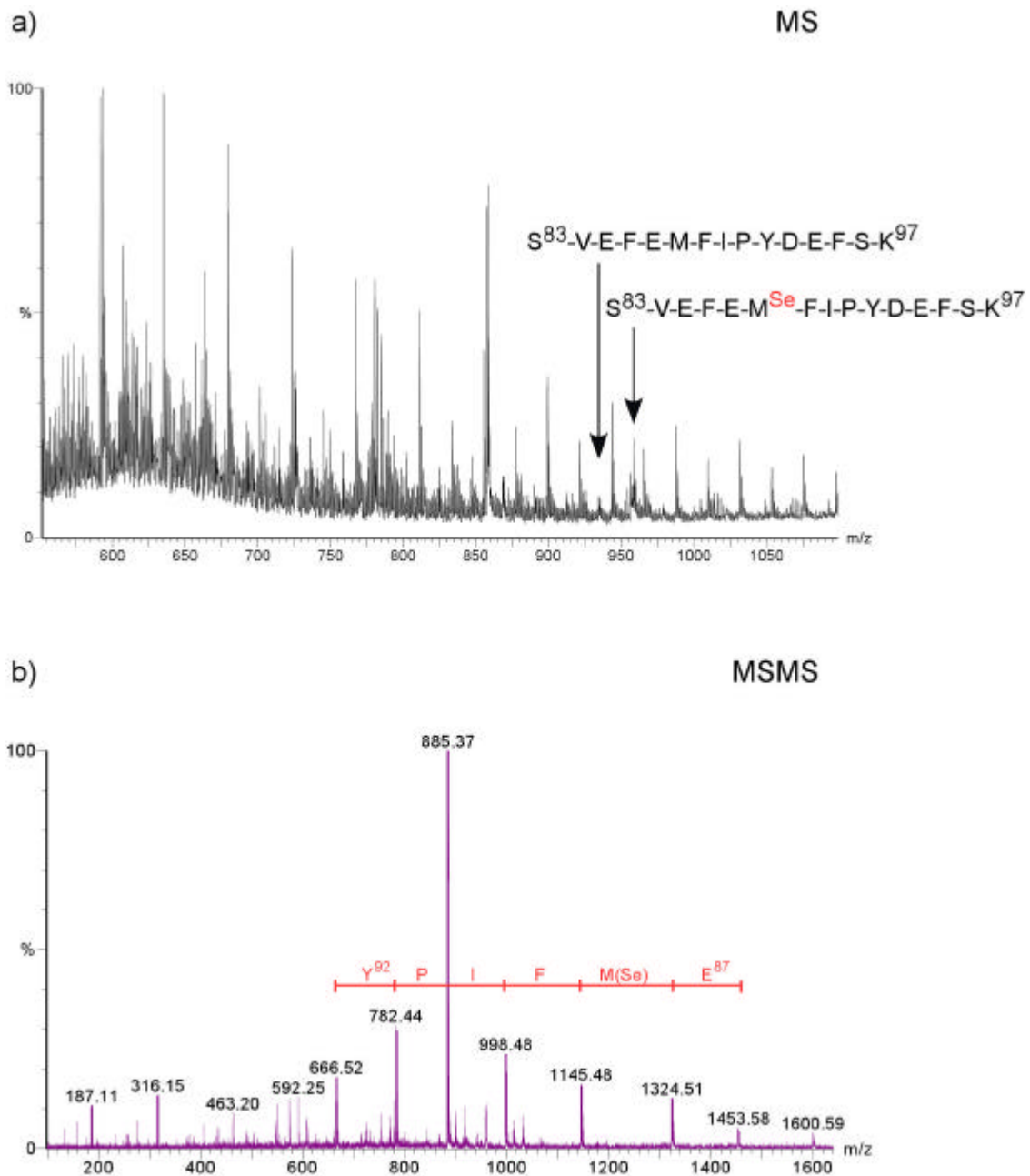


Abbildung 8: Massenspektren von SeMet-CsCBM27-1. a) Massenspektrum nach tryptischem Verdau. Die Peaks der doppelgeladenen Peptide SVEFEMFIPYDEFSK ohne SeMet ($m/z = 933,9$) entsprechen 1866.83 Da) und mit SeMet ($m/z = 958,4$; 1914.83 Da) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. b) Fragmentationenspektrum des SeMet enthaltenden Peptids.

3.5 Datensammlung

Von dem *Peak*-Datensatz (siehe Absatz 2.3.2) konnten alle Diffraktionsbilder (80 Bilder, $\Delta\varphi = 1^\circ$) zur Datenauswertung herangezogen werden und nach Indizierung der Raumgruppe $P2_12_12_1$ zugeordnet werden. Die 1,86 Å Daten zeigten eine Vollständigkeit von 89,9% und einen akzeptablen R_{merge} von 4,8%. Jeder Reflex wurde durchschnittlich 5,6-mal gemessen. Die jeweils 120 Diffraktionsbilder (Abbildung 9) des hoch und niedrig aufgelösten Datensatzes (siehe Absatz 2.3.2), die jeweils in $\Delta\varphi = 1^\circ$ Schritten gemessen wurden, ließen sich problemlos prozessieren.

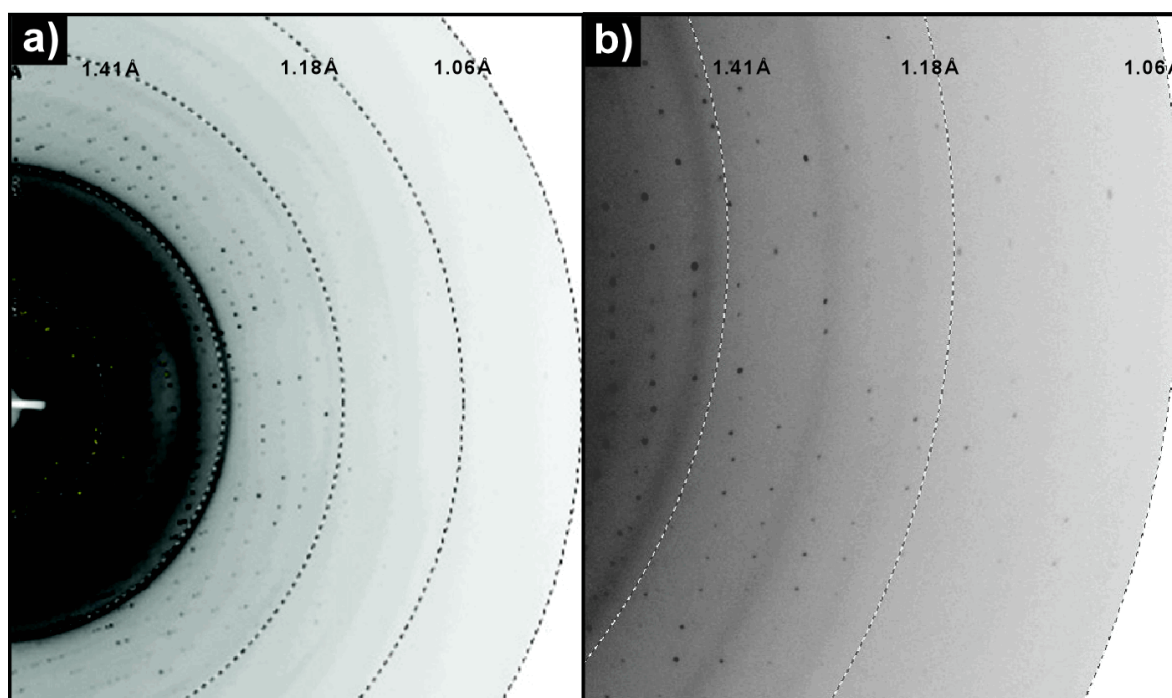


Abbildung 9: Diffraktionsmuster des CsCBM27-1/Mannohexaose-Kristalls a) Ausschnitt eines Diffraktionsbildes des hochaufgelösten Datensatzes. b) Vergrößerung in den sehr hohen Auflösungsbereich der Aufnahme a).

Auch hier konnte eindeutig die Raumgruppe $P2_12_12_1$ indiziert werden. Nach dem Zuskalieren der beiden Datensätze ergaben sich eine Vollständigkeit von 95,9 % und ein R_{merge} von 9,3 %. Bei den 80 Diffraktionsbildern des nativen Kristalls ohne Substrat zeigte es sich, dass die Qualität des Kristalls nach der 66. Aufnahme durch starken Abfall in der Diffraktionsintensität drastisch abnimmt. Dies kann auf Strahlenschäden des Kristalls zurückgeführt werden. Andere Gründe, wie abfallende Röntgenstrahlintensität oder ein Herausdrehen des Kristalls aus dem Röntgenstrahl konnten ausgeschlossen werden. Leider

konnte wegen der Unvollständigkeit des Datensatzes bis zu diesem Punkt auf die letzten 14 Diffraktionsbilder nicht verzichtet werden. In Tabelle 2 sind die Beugungsdaten für alle Kristalle zusammengefasst.

Tabelle 2: Statistik der Datensammlung

Datensatz	CsCBM27-1 in Komplex mit Mannoheptaose		CsCBM27-1
	Peak	Hoch/Niedrig	Nativ
<i>Kristallographische Parameter</i>			
Wellenlänge	0,9795	0,97981	0,97626
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellparameter [Å]	a = 38,28 b = 45,70 c = 110,11	a = 38,28 b = 45,70 c = 110,11	a = b = 54,99 c = 115,78
Datensammlungsstatistik ^a			
Auflösung [Å]	30,00 – 1,86 (1,90 – 1,86)	35,00 – 1,06 (1,15 – 1,06)	24,6 – 1,55 (1,59 - 1,55)
Vollständigkeit [%]	89,8 (74,7)	95,9 (82,5)	98,6 (98,3)
durchschnittliche I/σ?	34,6	9,0	13,6
R _{merge} [%] ^b	4,8 (9,0)	9,3 (35,8)	5,1 (37,2)
Redundanz	5,6	5,0	4,1
Anzahl der unabhängigen Reflexe	27.788 (1544)	81.658	26.236 (1708)
^a In Klammern stehen die Werte für die letzte Auflösungsschale. ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} (\sum_i I_i - \langle I \rangle)}{\sum \langle I \rangle}$ mit I_i der Intensität des beobachteten hkl Reflexes und $\langle I \rangle$ der durchschnittlichen Intensität dieses Reflexes			

Der Kristall ließ sich auf die Punktgruppe P422 indizieren (genaue Raumgruppenbestimmung war erst während des Prozesses der Strukturanalyse möglich). Der Lösungsmittelanteil in den Komplexkristallen war ähnlich dem in den substratfreien Kristallen. Über den Matthews-Koeffizienten [77] konnte der Lösungsmittelanteil für Kristalle mit substratgebun-

dem CsCBM27-1 zu ~44% abgeschätzt werden unter der Annahme von einem Proteinmolekül pro asymmetrischer Einheit.

3.6 Phasenbestimmung, Strukturanalyse und Verfeinerung

3.6.1 Komplexstruktur: CsCBM27-1 mit Mannoheptaose

Bei der SAD-Phasenbestimmung mit dem Programm SOLVE [63] wurden eindeutig zwei Maxima in der Patterson-Funktion auf der Basis der anomalen Differenzen mit durchschnittlicher normalisierter Peakhöhe von 5624 (1000 entsprechen 1σ) gefunden. Da das CsCBM27-1 als Monomer vorliegt und es zwei Methionine besitzt, konnte davon ausgegangen werden, daß die beiden immer wieder gefundenen Maxima den Selenatomen in den beiden Selenomethioninen entsprachen. Aus der Phasenverfeinerung mittels Dichtemodifikation (solvent flattening) resultierte eine Elektronendichte, in der 51 Aminosäurereste mit kompletten Seitenketten und eine Polyalaninkette von 81 Resten automatisch eingebaut werden konnte (RESOLVE [64]).

Im Programm ONO [65] konnten anschließend weitere 183 von 185 noch fehlenden Aminosäuren in die Elektronendichte eingebaut werden. Die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren konnten aufgrund ihrer Flexibilität oder proteolytischen Abbau (wurde nicht weiter untersucht), nicht in die Elektronendichte modelliert werden.

Das so entstandene Proteinmodell wurde gegen die experimentellen Daten (Strukturfaktoramplituden) nach der *maximum-likelihood* Methode im Programm REFMAC verfeinert, mit einem resultierenden $R_{\text{cryst}} = 25,6 \%$ und $R_{\text{free}} = 31,75 \%$. Nach der Erweiterung des Datensatzes für die Berechnung des R_{free} und Phasenerweiterung auf Grundlage des atomaren Modells wurde eine weitere Verfeinerung gegen die zusammenskalierten hochaufgelösten Daten vorgenommen. Mit dem Programm ARP-wARP [70] wurden 287 Wassermoleküle platziert und nach visueller Überprüfung auf 282 reduziert. Nach Berücksichtigung vorhandener alternativer Konformationen der Aminosäureseitenketten konnte die Proteinstruktur bis zu einem $R_{\text{cryst}} = 14,1\%$ und $R_{\text{free}} = 17,0\%$ verfeinert werden. Der mittlere atomare Auslenkungsfaktor der gesamten Struktur beträgt $B = 17,6 \text{ \AA}^2$. In Tabelle 3 sind die Daten der Verfeinerungsstatistik zusammengefasst.

Tabelle 3: Verfeinerungsstatistik

Datensatz	CsCBM27-1 im Komplex mit Mannohexaose	
	Peak	Hoch/Niedrig
Verfeinerungsstatistik	Verfeinerung mit isotropen B-Faktoren	Verfeinerung mit anisotropen B-Faktoren
Auflösungsgrenzen (Å)	30,00 – 1,86	35,00 – 1,06
Anzahl der verwend. Reflexe für Verfeinerung	19.824	80.596
R _{cryst} [%]	25,6	14,1
R _{free} [%]	31,75	17,0
Modellinhalt		
Aminosäurereste	183	183
H ₂ O / Ca ²⁺		282 / 1
Mannohexaose		1
RMSD von der idealen Geometrie		
Bindungslängen [Å]		0,014
Bindungswinkel [°]		2,070
Protein-Datenbank-Eintrag		1PMH

In dem Ramachandran-Diagramm (Abbildung 10) ist die Verteilung der ϕ/ψ -Winkel für das Peptidrückgrat des Proteins dargestellt und zeigt, dass sich 87,1% der Aminosäuren in den am meisten favorisierten Bereichen und weitere 12,3% sich in zusätzlich erlaubten Regionen befinden. Nur Lysin 28 nimmt unerlaubte ϕ/ψ -Winkel an ohne ersichtlichen Grund. Dieser Aminosäurerest zeigt zwar eine alternative Konformation für die Atome C _{β} , C _{γ} , C _{δ} , C _{ϵ} und N _{ϵ} der Seitenkette, ist aber in diesem Bereich durch gute Elektronendichte erklärt. Der B-Faktor für die Seitenkette der Konformation A ist ~ 26 Å², für das Rückgrat ~ 18 Å². Lysin 28 ist weder an der Bindung von Mannohexaose noch an Kristallpackungskontakten beteiligt.

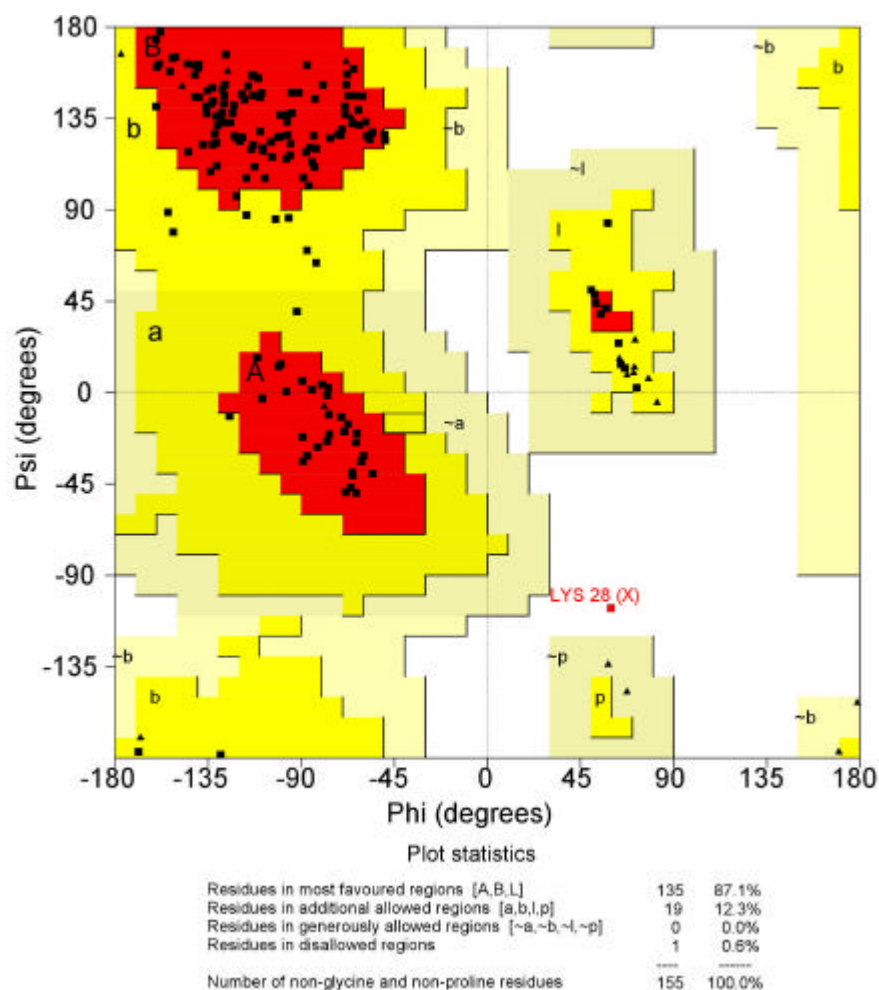


Abbildung 10: Ramachandran-Diagramm von CsCBM27-1 in Komplex mit Mannoheptaose. Rote Bereiche zeigen die energetisch bevorzugten Hauptkettenkonformationen, gelbe die zusätzlich erlaubten Bereiche und in beige sind die gerade noch erlaubten Bereiche abgebildet. Der weiße Bereich stellt die unerlaubten Konformationen dar. Die Glycin-Reste sind als schwarze Dreiecke und alle übrigen Reste (ausschließlich Prolin) als schwarze Rechtecke.

3.6.2 CsCBM27-1 ohne Substrat

Zur Strukturanalyse wurde die Methode des molekularen Ersatzes mit der CsCBM27-1/Mannoheptaose-Struktur als Modell mit verschiedenen Raumgruppen der Punktgruppe 422 durchgeführt, da bis hier die endgültige Raumgruppenzuordnung nicht bestimmt werden konnte. Es wurde beobachtet, dass bei den Reflexen $h00$ und $0h0$ nur geradzahlige Reflexe vorkommen, so dass nur eine 2_1 Schraubenachse, aber keine 2-zählige Drehachse vorkommen kann. Desweiteren konnte aufgrund des Diffraktionsmusters ($00l$ -Reflexe) ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung zwischen den anderen drei Raumgruppen $P4_12_12$, $P4_22_12$ und $P4_32_12$ war nicht möglich. Für diese drei Raumgruppen wurde eine Rotations- sowie

jeweils eine Translationssuche durchgeführt mit anschließender Verfeinerung als starren Körper (*rigid body*). Die Unterschiede zwischen der richtigen und den falschen Lösungen waren nach der Translationssuche und der *rigid body*-Verfeinerung deutlich an den Korrelationskoeffizienten und R-Faktoren erkennbar. Die richtige Lösung wurde für die Raumgruppe $P4_12_12$ gefunden, da hier der höchste Korrelationskoeffizient für die Strukturfaktoren und der niedrigste R-Faktor gefunden wurde. Der R-Faktor sollte nach der Rotations- und Translationssuche deutlich unter 59% liegen, dem Erwartungswert der statistischen Verteilung der Atome in der Elementarzelle [78]. In Tabelle 4 sind die Korrelationskoeffizienten und R-Faktoren für alle in Frage kommenden Raumgruppen für die Rotations- und Translationssuche sowie der *rigid body* Verfeinerung zusammengefasst.

Tabelle 4: Molekularer Ersatz – Korrelationskoeffizienten und R-Faktoren

Korrelationskoeffizient der F^a / R-Faktor [%]	$P4_32_12$	$P4_12_12$	$P4_22_12$
Rotation ^b	12,0 / -		
Translation	0,335 / 49,3	0,520 / 42,3	0,227 / 53,1
Verfeinerung	0,401 / 46,6	0,655 / 37,0	0,232 / 52,0
^a F – Strukturfaktoren			
^b R-Faktoren für Rotationssuche nicht gezeigt, da hier noch nicht relevant.			

Bei der weiteren Modellbearbeitung in ONO wurden alle Seitenketten ausgerichtet und beobachtete alternative Konformationen eingeführt. Auch hier konnte keine interpretierbare Elektronendichte für die ersten beiden N-terminalen Aminosäurereste beobachtet werden und demzufolge konnten diese beiden Aminosäurereste nicht eingebaut werden. Die Struktur konnte mit anisotropen *B*-Faktoren bis zu einem $R_{\text{cryst}} = 12,4$ % und $R_{\text{free}} = 17,4$ % verfeinert werden. Die Statistik dieser Strukturverfeinerung ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Verfeinerungsstatistik des ligandfreien nativen CsCBM27-1

Datensatz	CsCBM27-1 ohne Substrat
	nativ
<i>Verfeinerungsstatistik</i>	Verfeinerung mit anisotropen B-Faktoren
Auflösungsgrenzen (Å)	24,6 – 1,55
Anzahl der verwend. Reflexe für Verfeinerung	24.319
R _{cryst} [%]	0,123
R _{free} [%]	0,174
<i>Modellinhalt</i>	
Aminosäurereste	183
H ₂ O / Ca ²⁺	290 / 1
Mannohexaose	-
<i>RMSD von der idealen Geometrie</i>	
Bindungslängen [Å]	0,014
Bindungswinkel [°]	1,544
<i>Protein Datenbank Eintrag</i>	1PMJ

3.7 Die Kristallstruktur von CsCBM27-1 in Komplex mit Mannohexaose

Die Struktur von CsCBM27-1 mit gebundener Mannohexaose zeigt ein typisches *b-Sandwich jellyroll* Motiv, welches aus einem flachen fünfsträngigen β -Faltblatt, dem „hinteren Faltblatt“ (β -Stränge 1, 7, 10, 11 + 12, 15), einem konkav gekrümmten fünfsträngigen β -Faltblatt, dem „vorderen Faltblatt“ (β -Stränge 2, 5, 8, 9, 14) sowie dem „unteren Faltblatt“ mit 3 Faltblattsträngen (β -Stränge 3, 4, 15; β -Strang 15 geht in das hintere Faltblatt über) und zweier kurzer Helices im oberen und unteren Teil besteht (Abbildung 11). Alle Faltblätter sind

antiparallel angeordnet. Die Stränge sind durch Schleifen (*loops*) verbunden. Auf der Seite des vorderen Faltsblatts befindet sich die Bindungsstelle für den Zucker Mannohexaose. An der gegenüberliegenden hinteren Seite wurde eine Metallionen-Bindungsstelle identifiziert. Abbildung 12 auf der Seite 46 zeigt die schematische Anordnung der Sekundärelemente in Form eines Topologie-Diagramms.

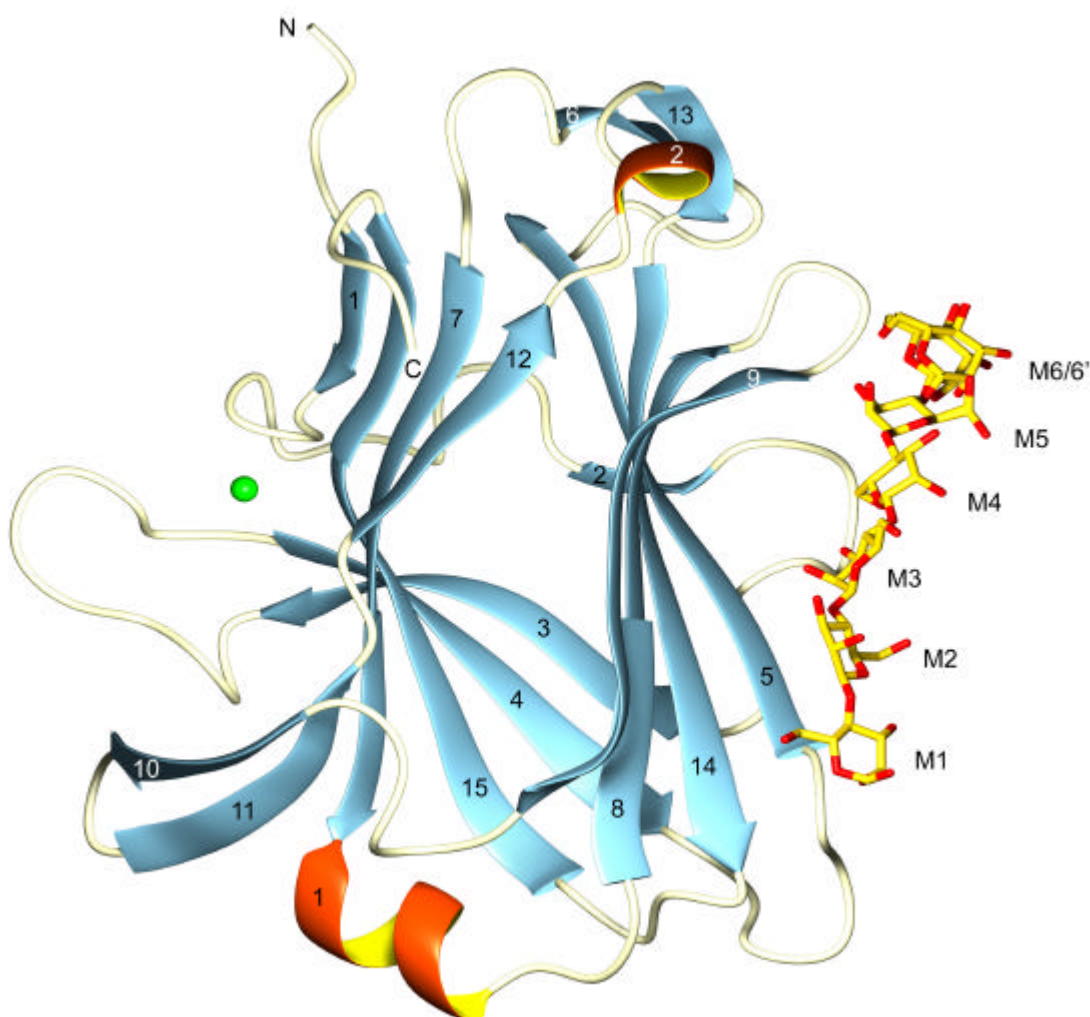


Abbildung 11: Struktur des CsCBM27-1 in Komplex mit Mannohexaose. Alle β -Stränge sind in blau und die Helices in rot/gelb dargestellt. Das Kalziumion ist als eine grüne Kugel und die gebundene Mannohexaose ist als Stab-Modell dargestellt mit den Atomfarben gelb für Kohlenstoff- und rot für Sauerstoff-Atome.

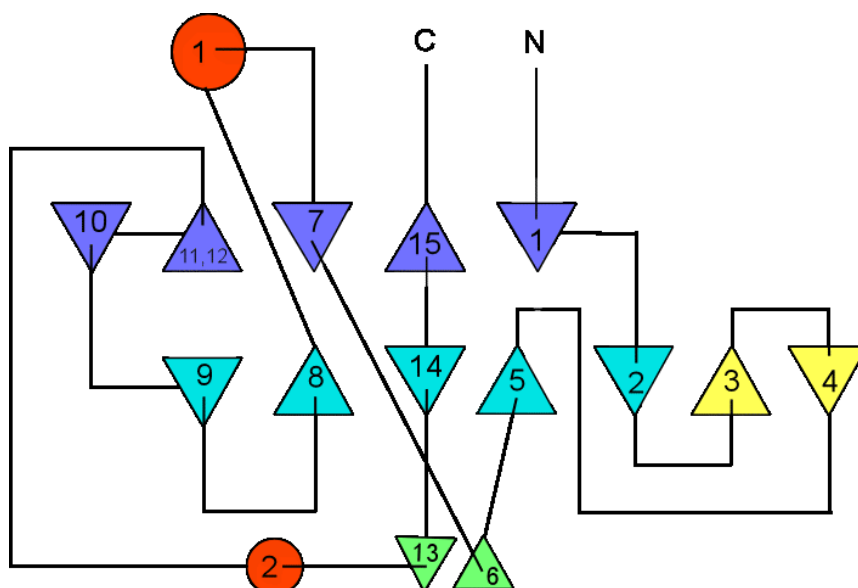


Abbildung 12: Topologie-Diagramm von CsCBM27-1. Dreiecke repräsentieren β -Stränge und Kreise Helices. Das hintere Faltblatt ist in violett und das vordere Faltblatt in türkis dargestellt. β -Stränge 11 und 12 sind aufgrund ihres kurzen Linkers (Verbindungsstück) und der Lage als ein β -Strang gezeigt. Gelbe Dreiecke stellen das untere Faltblatt dar und grüne Dreiecke das obere Faltblatt.

Die Metallionen-Bindungsstelle (Abbildung 13) ist mit einem Kalziumion besetzt, welches oktaedrisch durch die Seitenketten von E12, N44, D176 (Doppelkoordination) und den Hauptkettenkarbonylsauerstoffen von D10 und Y46 des CsCBM27-1 gebunden wird. Die sechste Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül vervollständigt. Die Annahme, dass es sich bei dieser Elektronendichte um ein Kalziumion handelt, wurde durch die Tatsache einer fehlenden Elektronendifferenzdichte nach Positionierung und Verfeinerung mit einem Kalziumion bestätigt. Desweiteren wird diese Besetzung bekräftigt durch den resultierenden niedrigen B-Faktor ($B = 16,5 \text{ \AA}^2$ für Substrat-gebundene Struktur und $B = 10,0 \text{ \AA}^2$ für Ligandfreie Struktur) des Ions selber sowie durch die B-Faktoren der umgebenden Liganden ($B = 16,4 - 19,5 \text{ \AA}^2$ für Substrat-gebundene Struktur und $B = 10,2 - 12,0 \text{ \AA}^2$ für Substrat-freie Struktur). Die Herkunft des Kalziumions erfolgt höchstwahrscheinlich aus den Zellen selber, da während der Proteinexpression sowie Reinigung keine kalziumhaltigen Komponenten verwendet wurden.

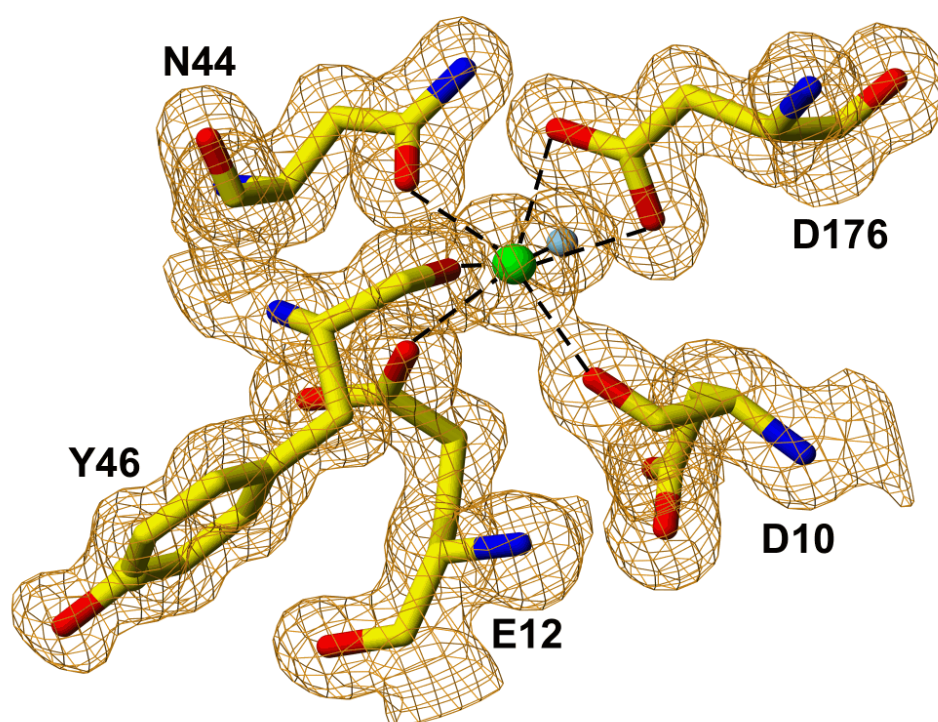


Abbildung 13: Kalziumionen-Bindungsstelle des CsCBM27-1. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichte, konturiert bei $1,0 \sigma$, zeigt den Koordinationsbereich um das Kalziumion (grün). Das an der Bindung beteiligte Wassermolekül ist als helle blaue Kugel dargestellt.

Die Zuckerbindungsfurche des CsCBM27-1 erstreckt sich diagonal über vier β -Stränge des vorderen β -Faltblatts, siehe Abbildung 11 und Abbildung 14. Diese Bindungsstelle ist ähnlich der in TmCBM27 und bei Vertretern der CBM-Familien 4, 15, 17, 22 und 29 beobachteten Bindungsstellen [12, 13, 14, 18, 38, 79]. Die Mannopyranoseringe der Zuckeruntereinheiten 2, 4 und 5 zeigen hydrophobe Kontakte in lang gestreckter Form zu den Oberflächen der drei Lösungsmittel zugänglichen Tryptophanreste W23, W60 und W113, welche eine aromatische Plattform in der Kohlenhydrat-Bindungstasche bilden. Aromatische Aminosäuren an der Proteinoberfläche, die an der Polysaccharidbindung mittels Wechselwirkung durch eine Art Stapelung (*stacking*) mit den Zuckerringen beteiligt sind, wurden ebenfalls in anderen CBM-Familien beobachtet [12, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 38, 73, 79]. Fünf der sechs Mannosereste konnten problemlos in die Elektronendichte modelliert werden. Die Dichte des sechsten Mannoserestes ist deutlich schlechter zu interpretieren. Zusätzlich nimmt diese Zuckereinheit noch eine alternative Konformation an. Die Lösungsmittelzugänglichkeit am Ende der Kohlenhydratkette und die nicht sehr stark ausgeprägte Wechselwirkung mit CsCBM27-1 scheinen dafür verantwortlich zu sein. Dies ist in Abbildung 14 dargestellt.

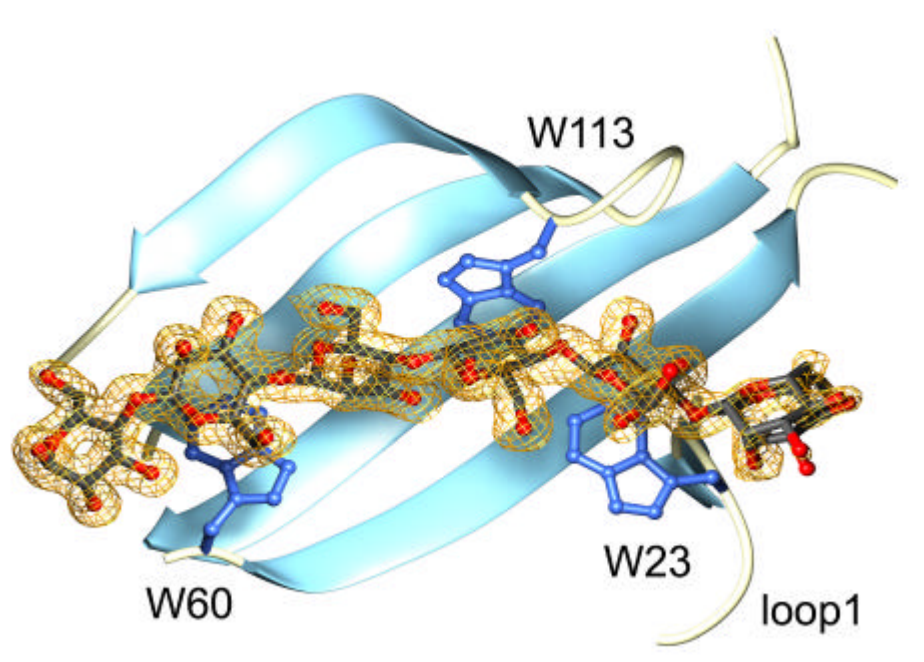


Abbildung 14: Mannoheptaose-Bindungsfurche des CsCBM27-1. Die vier β -Stränge, welche die Bindungstasche darstellen, sind in hellem Blau gezeigt. Die drei die aromatische Plattform ausbildenden und Zucker bindenden Tryptophanreste sind in dunkelblauer Kugel-Stab Darstellung zu sehen. Die Mannoheptaose ist als rot/dunkelgraue Kugel-Stab Darstellung mit der alternativen Konformation an der sechsten Untereinheit abgebildet. Um das Mannoheptaose-Molekül ist die $2F_o-F_c$ Elektronendichte in Gold bei 1σ konturiert.

In Abbildung 15 ist neben den aromatischen Kontakten die Bindung von CsCBM27-1 an Mannoheptaose durch sechs direkte Wasserstoffbrücken der polaren Aminosäuren K106, N110, Q157 und Q161 zu den Hydroxylgruppen der Mannoheptaose schematisch charakterisiert. Die Aminosäuren Q62, N121, R155, Q157 und Q165 positionieren ein Wassermolekül zur Bindung an die Hydroxylgruppen oder O5' der Zuckerringe. Es existieren zwei Wechselwirkungen zwischen der Mannoheptaose und den Carbonylsauerstoffen des G59 und A22 im Protein-Rückgrat, die über ein Wassermolekül vermittelt werden.

Zusätzlich wurden Kristallpackungskontakte zwischen den Resten G112, E74, Q76, D111, K153 und N166 eines symmetrieverwandten Proteinmoleküls und Mannoheptaose beobachtet. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass Wasser direkt in der Interaktion von Protein zu Ligand durch Solvatisieren der polaren Aminosäureseitenketten und durch Vermittlung der Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist.

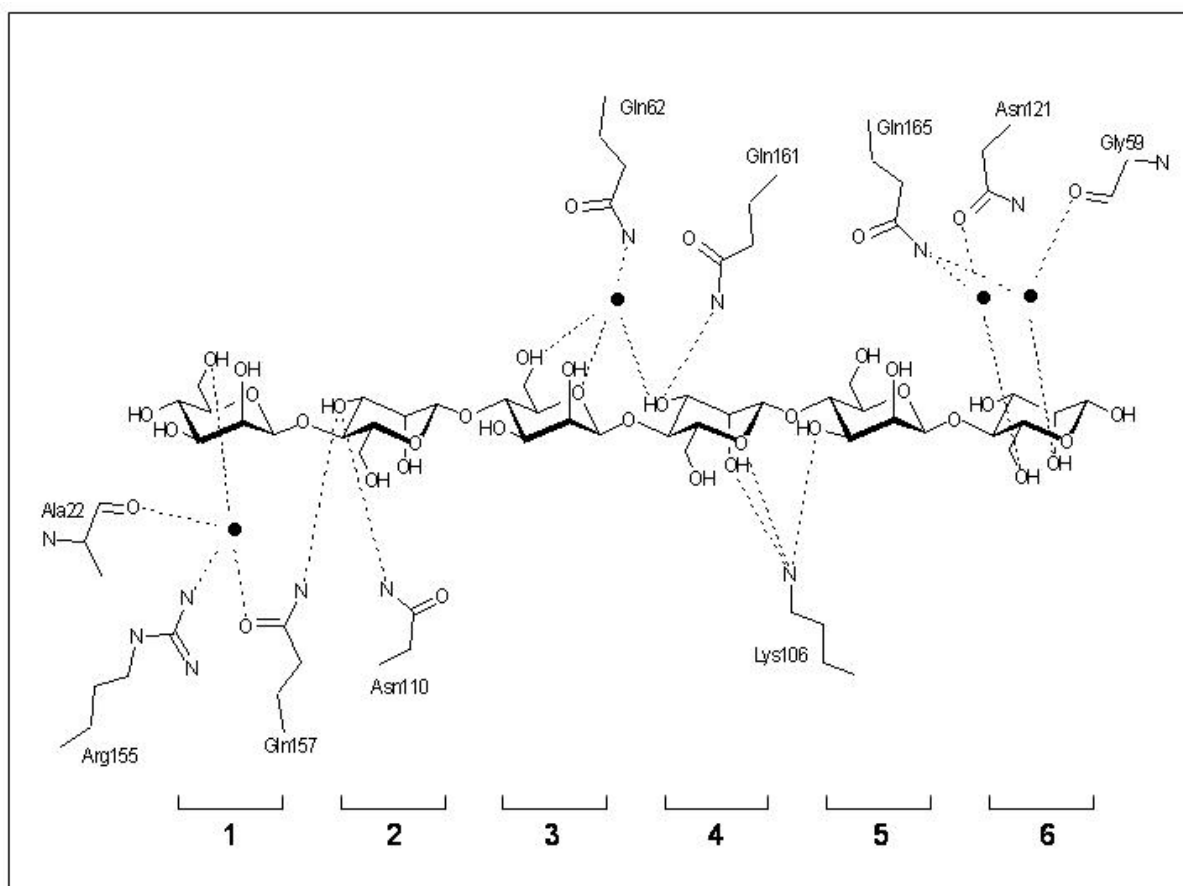


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bindung des CsCBM27-1 an Mannoheptaose. Die Positionen der sechs Mannoseuntereinheiten sind unten angegeben und mit dem nicht reduzierenden Ende beginnend nummeriert. Die vier involvierten Wassermoleküle sind als schwarze Punkte dargestellt. Die Bezeichnung der Aminosäurereste entspricht der Nummerierung wie sie im Protein Datenbank (PDB)-Eintrag vorliegt.

3.8 Vergleich der Kristallstrukturen der freien und Liganden-gebundenen CsCBM27-1 Struktur

In der Gesamtheit sind die Strukturen des CsCBM27-1 in freier und Liganden-gebundener Form nahezu identisch (Abbildung 16a). Geringe Konformationsänderungen durch Mannoheptaose-Bindung wurden für die C_{α} -Atome aller Aminosäurereste gesehen, mit einer r.m.s. (*root mean square*)-Abweichung von 0,57 Å, welche hauptsächlich von der unterschiedlichen Lage des N- und des C-Terminus herrührt. Es wurden keine signifikanten Änderungen (r.m.s.-Abweichung 0,26 Å für C_{α} -Atome) der Proteinhauptkette in der Bindungsfurche durch die Zuckerbindung festgestellt. In der Komplexstruktur wurden nur für vereinzelte Aminosäure-

reseitenketten, die an der Mannohexaose-Bindung beteiligt sind, größere Positionsänderungen beobachtet. Die am stärksten ausgeprägten Änderungen befinden sich in den Seitenkettenpositionen für die polaren Aminosäuren Q62, K106, N121, Q161 und Q165 mit r.m.s.-Abweichungen zwischen 2,2 und 5,8 Å (Abbildung 16b), die hauptsächlich durch eine Rotation um $\sim 180^\circ$ der Amidgruppen in den Seitenketten der Glutamine herrührt.

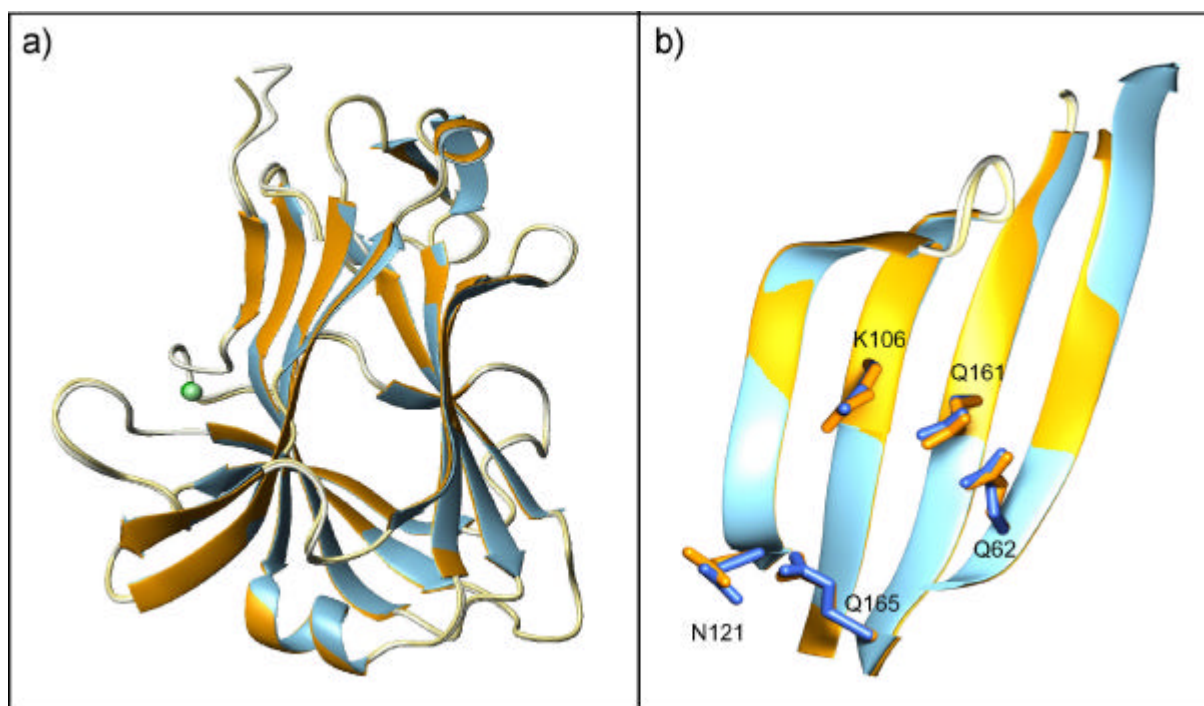


Abbildung 16: Überlagerung der Zucker-gebundenen und der Liganden-freien Struktur des CsCBM27-1. In hellem Blau ist die Komplexstruktur (Mannohexaose nicht gezeigt) und in orange ist CsCBM27-1 ohne Mannohexaose dargestellt. a) Überblick über gesamte Strukturüberlagerung. Das gebundene Kalziumion ist für die CsCBM27-1/Mannohexaose Struktur als dunkelgrüne Kugel und für die ungebundene Form als hellgrüne Kugel dargestellt. b) Blick in die Zuckerbindungsfurche mit Aminosäuren größerer r.m.s.-Abweichung. In orange sind die β -Stränge und die entsprechenden Reste der Liganden-freien Struktur dargestellt, die blauen β -Stränge und Reste entsprechen der Komplexstruktur.

Änderungen in geringerem Ausmaß wurden für die Seitenketten der Reste N110, R155, Q157 und für die die aromatische Plattform ausbildenden Aminosäuren W23, W60 und W113 gesehen (r.m.s.d. zwischen 0,27 und 0,48 Å).

Demzufolge ist die Struktur des CsCBM27-1 in freier und Mannohexaose-gebundener Form eine sehr starre Struktur, da keine essentiellen Änderungen allgemein und selbst innerhalb der Liganden-Bindungs tasche zu beobachten waren. Dieses Ergebnis wurde auch für andere CBM – Ligand Strukturen gesehen [13, 18, 38, 80]. Es passt in das Konzept der „vorgefertigten“ Bindungsstellen, in denen keine strukturelle Umordnung für die Bindung

erforderlich ist, ähnlich wie es für Lectine und Glykosylhydrolasen mit *jellyroll*-Faltungstyp zu sehen ist [81, 82].

3.9 Ähnlichkeit zu anderen CBMs

Die Suche nach strukturell ähnlichen CBMs in allen CBM-Familien erfolgte mit dem Programm DALI unter Verwendung von Abstandsmatrizes [83]. Es zeigte sich, dass CsCBM27-1 mit einer r.m.s.-Abweichung von 2,7 Å (für C_α Atome) die größte Ähnlichkeit zu der unmittelbar familiär verwandten CBM27 aus *T. maritima* (PDB ID: 1OF3) mit 158 von 171 übereinstimmenden C_α-Positionen aufwies. Die Sequenzen beider Proteine sind zu 22% identisch. Zu drei weiteren CBMs wurden ebenfalls relativ hohe Ähnlichkeiten festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Strukturelle Ähnlichkeiten von CsCBM27-1 zu weiteren CBM-Familienmitgliedern.

CBM Familie	Organismus	r.m.s.d. C _α [Å]	übereinstimmende C _α	Gesamtanzahl Aminosäuren	PDB Eintrag
CBM29-2	<i>P. equi</i>	3,0	124	141	1GWL
CBM4	<i>C. fimi</i>	3,0	121	155	1GUI
CBM6	<i>C. thermocellum</i>	3,1	114	126	1GMM
CBM17	<i>C. cellulovorans</i>	3,2	139	178	1J83
CBM15	<i>P. cellulosa</i>	3,2	136	153	1GNY

Vergleiche zu Strukturen, die nicht der CBM-Familie angehören, ergaben, dass die höchste Ähnlichkeit mit einer r.m.s.-Abweichung von 3,4 Å zu Calnexin (PDB ID: 1JHN), einem Lectin-ähnlichen molekularen Chaperon, mit einer Oligomannosid-Erkennungsstelle vorlag. Desweiteren zeigte CsCBM27-1 eine geringe strukturelle Übereinstimmung zu der dritten Domäne des Toxins aus *Bacillus thuringiensis* (PDB ID: 1CIY) mit einer r.m.s.-Abweichung von 3,6 Å und zu dem Lectin aus *Griffonia simplicifolia* (PDB ID: 1LED) mit r.m.s.-Abweichung von 3,9 Å.

3.9.1 Vergleich der beiden strukturellen Vertreter der CBM27 Familie

Der detailliertere Vergleich von CsCBM27-1 (PDB ID: 1PMH) mit *Tm*CBM27 (PDB-ID: 1OF4) aus der DALI-Datenbanksuche [83] zeigt deutlich, dass beide Strukturen annähernd die gleichen entgegengesetzt orientierten konkaven Oberflächen besitzen und beide Mitglieder jeweils Mannohexaose als Ligand gebunden haben. Basierend auf der Strukturanpassung mit DALI wurden alle β -Stränge von *Tm*CBM27 auf CsCBM27-1 (81 von 170 Aminosäuren) mit dem Programm LSQKAB [69] überlagert. Dies zeigte eine r.m.s.-Abweichung der Hauptkette von 1,42 Å und für die C_{α} -Atome 1,37 Å. Durch die strukturelle Überlagerung wird deutlich, wie gut die β -Faltblattstruktur konserviert ist.

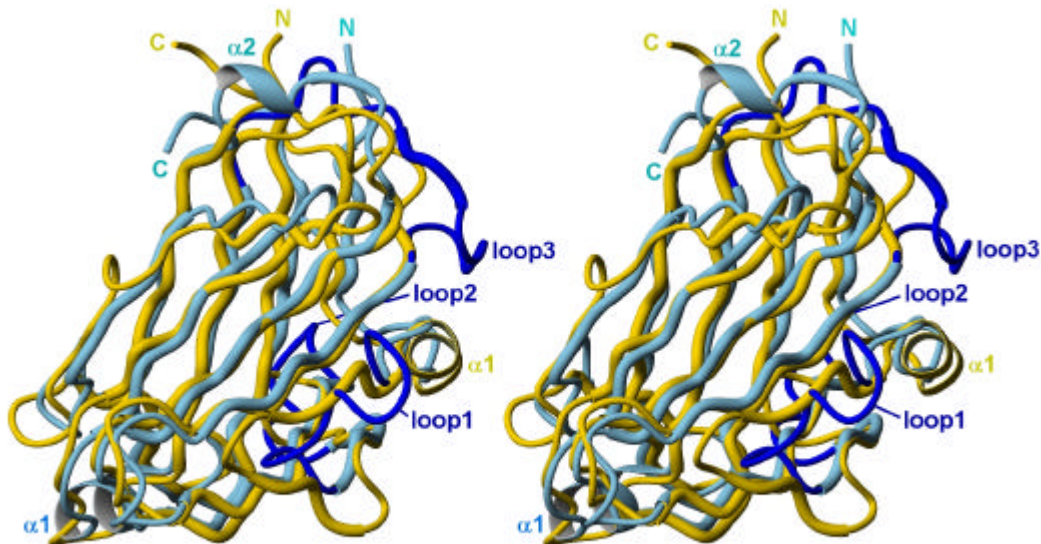


Abbildung 17: Stereo-Darstellung der Überlagerung von *Tm*CBM27 in Gold mit CsCBM27-1 in hellem Blau. Die hauptsächlichen strukturellen Unterschiede in den Schleifenbereichen sind in CsCBM27-1 in dunklem Blau hervorgehoben. Die Schleifen wurden entsprechend ihrer Abfolge in der Struktur nummeriert.

Die größten strukturellen Unterschiede sind hauptsächlich in den Schleifenregionen, welche in Länge und Position variieren, sowie in der Art und Weise der Zucker-Bindung zu beobachten (Abbildung 17). In CsCBM27-1 befinden sich zwei Bereiche mit weitaus längeren Schleifen im Vergleich zu *Tm*CBM27. *Loop 2* ist in beiden Strukturen in der Kalziumionen Bindung involviert und ist in CsCBM27-1 um drei Aminosäuren länger. Die dritte Schleife ist um sieben Reste (Aminosäuren 69 - 83) länger in CsCBM27-1 verglichen zu *Tm*CBM27 (Aminosäuren 69 -76). Dieser ausladendere *Loop 3* könnte eventuell in CsCBM27-1 eine zusätzli-

che Rolle bei der Bindung der sechsten Mannoseeinheit der Mannohexaose spielen. Dies wird aufgrund der Ausrichtung der Seitenkette der auf der Schleife gelegenen Glutaminsäure 74 angenommen. Diese zeigt direkt zu der OH-Gruppe der sechsten Mannohexaoseuntereinheit (C6) mit einem Abstand von 3.79 Å. Diese Orientierung könnte zu der ungefähr zehnfach höheren Affinität des CsCBM27-1 zu Mannohexaose beitragen, verglichen mit TmCBM27-1 [38].

Eine komplett andere Anordnung ist für *loop 1* (Aminosäuren 22 - 32) in CsCBM27-1 als in TmCBM27-1 (Reste 25 – 36) zu sehen. In beiden Schleifen ist jeweils einer der drei Tryptophanreste, die hauptsächlich an der Bindung der Mannohexaose beteiligt sind, lokalisiert (Abbildung 14, Seite 48). Die unterschiedliche Ausrichtung der Schleifen hat zur Folge, dass der Tryptophanrest 23 in CsCBM27-1 ungefähr 12 Å entfernt (C α -Atome) von dem Tryptophanrest 28 in der equivalenten Schleife von TmCBM27 liegt (Abbildung 18).

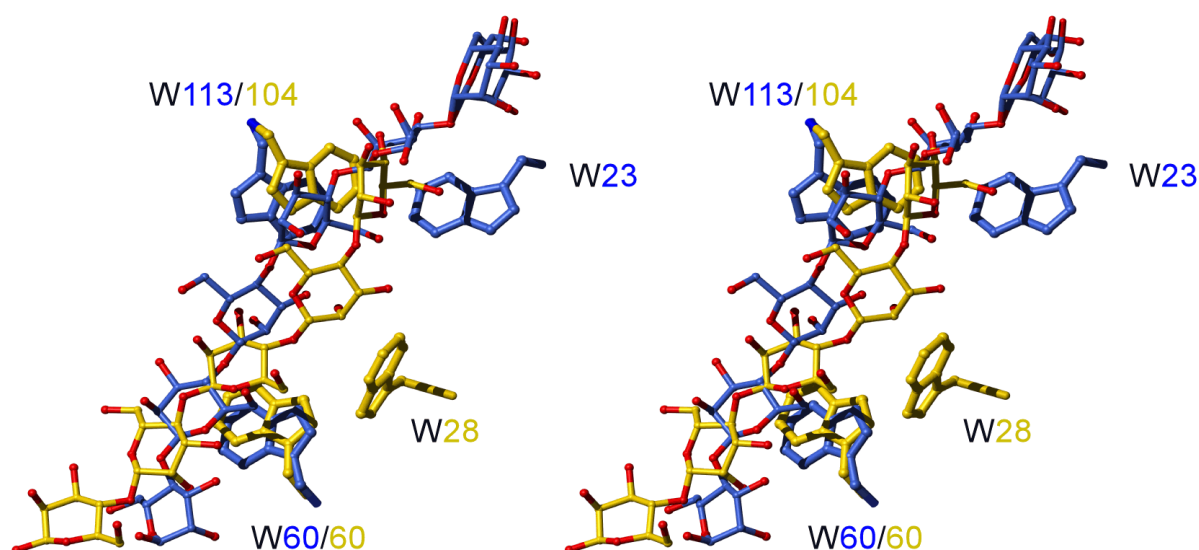


Abbildung 18: Stereo-Abbildung der Überlagerung der gebundenen Mannohexaose in CsCBM27-1 und in TmCBM27. Die Tryptophanreste, die an der Bindung beteiligt sind, sowie die Mannohexaose ist für CsCBM27-1 in blau und für TmCBM27 in gelb dargestellt. Es wurden die C α -Atome der Tryptophanreste überlagert.

Die beiden anderen zuckerbindenden Tryptophanreste W60 und W113 in CsCBM27-1 liegen co-planar mit ihren equivalenten W60 und W104 in TmCBM27 und zeigen im Gegensatz zu W23 keine signifikante Abweichung in ihrer Lage. Für den genauen Vergleich der Mannohexaose-Bindungsgeometrie beider Mitglieder der CBM 27-Familie, wurden drei der vier β -Stränge der Bindungsfurche in CsCBM27-1 (Aminosäurereste 57 - 68, 100 - 109 und 156 - 166) mit den entsprechenden β -Strängen des TmCBM27 (Reste 57 - 68, 91 - 100 und 145 -

155) überlagert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die aromatischen Tryptophanreste, die an der Mannohexaose-Bindung beteiligt sind, genau mit ihrer C α – Position übereinstimmen (Abbildung 18). Die r.m.s.-Abweichung der Hauptketten für dieses vordere β -Faltblatt betrug 1,03 Å. Für diese Überlagerung wurde ein bemerkenswerter Unterschied in der Weise, wie die Mannohexaose von beiden Modulen gebunden wurde, sichtbar. In beiden Fällen ist die Ausrichtung der Mannohexaose bezüglich des reduzierenden zum nicht-reduzierendem Ende die gleiche, jedoch liegen die Zuckerringflächen der Mannohexaose in CsCBM27-1 um $\sim 180^\circ$ gedreht zu den Flächen der Mannohexaose in TmCBM27. Die gebundene Mannohexaose in der TmCBM27-Struktur biegt sich etwas aus der Bindungsfurche dem Lösungsmittel entgegen, während in CsCBM27-1 die Zuckerkette sich mehr entlang der Furche anordnet. Die unterschiedliche Krümmung der Zuckerkette zusammen mit der Zuckerringflächenrotation und einer geringen Verlagerung der an CsCBM27-1 gebundenen Mannohexaose um ungefähr eine halbe Mannoseuntereinheit in Richtung auf *loop* 3 (bei direktem Blick auf das vordere β -Faltblatt) hat zur Folge, dass die aromatischen Flächenkontakte der Tryptophane beider Module zu unterschiedlichen Untereinheiten des Zuckers erfolgen. Mannohexaoseuntereinheit 2 ist in CsCBM27-1 an Trp 60 und Untereinheit 4 an Trp 113 gebunden, während die equivalenten Trp 60 und Trp 104 von TmCBM27 an Mannohexaoseuntereinheiten 3 und 5 binden (Abbildung 18, Seite 53). Während Trp 23 in CsCBM27-1 mit Mannoseeinheit 5 wechselwirkt, steht das equivalente Trp28 des TmCBM27 mit Mannoseeinheit 4 in Kontakt. Dieser Unterschied ist durch die Positionierung von Trp23 in CsCBM27-1 und Trp28 in TmCBM27 begründet. Bei direkter Überlagerung der beiden Strukturen unterscheidet sich die Lage der equivalenten Tryptophane um 12 Å (C α -Abstand).

Beide CBM 27-Familienmitglieder binden den gleichen Zucker mit bemerkenswertem Unterschied in der Bindungsstärke. Folglich könnte die ~ 10 -fach stärker ausgeprägte Affinität des CsCBM27-1 für Mannohexaose weiter durch die unterschiedliche Positionierung der die Plattform ausbildenden, aromatischen Reste erklärt werden. In CsCBM27-1 überspannen die entscheidenden drei Tryptophanreste einen viel umfassenderen Bereich in der Zuckerbindungstasche als es der Fall für TmCBM27 ist. Dies resultiert in einer weitaus ausgedehnteren Kontaktfläche für den interagierenden Liganden.

Das gebundene Kalziumion in der Kristallstruktur des CsCBM27-1 ist an der gleichen Stelle wie in der Struktur des verwandten TmCBM27 lokalisiert [38]. In beiden Strukturen befindet es sich an der Rückseite des *jelly-rolls*, gegenüberliegend der Liganden-Bindungsfurche.

3.10 Die Rolle des Kalziums für die Ligandenbindung und Stabilität von CsCBM27-1

Es wird vermutet, dass das Kalziumion für die Stabilität der Struktur eine wesentliche Rolle spielt, ähnlich wie es für die Mitglieder der CBM - Familien 4, 6, 17 und 22 festgestellt wurde [13, 15, 16, 75]. Es wurde bisher beobachtet, dass das Entfernen des Kalziumions die Anfälligkeit des Enzyms für proteolytischen Abbau ansteigen lässt [84] und die Stabilität der CBMs bei erhöhten Temperaturen verringert wird [75]. Dies deutet auf einen stabilisierenden Effekt des Kalziumions für die gesamte Struktur hin. Um die Funktion von Kalzium für das CsCBM27-1 zu bestimmen, wurden von dem Kooperationspartner Dr. Wolfgang Pfeil ITC-Bindungs- und Stabilitätsexperimente mit EDTA-behandelten CsCBM27-1 durchgeführt. Interessanterweise zeigte es sich hier, dass die Assoziationskonstante für die Bindung an Mannohehexaose nicht signifikant durch verschiedene EDTA Konzentrationen beeinflusst wurde (Tabelle 7). Im umgekehrten Fall konnte aber auch durch den Zusatz von bis zu 10 mM CaCl_2 keine Verbesserung der Bindung von Mannohehexaose gemessen werden.

Tabelle 7: Thermodynamische Werte für die Bindung von CsCBM27-1 an Mannohehexaose in Gegenwart von EDTA

	Konz. [mM]	K_a [$\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$]	DG [kJ mol ⁻¹]	DH [kJ mol ⁻¹]	DS [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	n ^a
EDTA [mM]	0	9,57 ± 0,4	-40,00 ± 0,01	-64,31 ± 0,03	-81,53 ± 0,14	1,02
	2,5	10,80 ± 0,8	-40,15 ± 0,02	-61,21 ± 0,06	-70,63 ± 0,26	0,90
	10	10,10 ± 0,5	-39,98 ± 0,01	-65,27 ± 0,04	-84,82 ± 0,17	0,85
CaCl₂ [mM]	10	9,42 ± 0,5	-39,82 ± 0,01	-65,98 ± 0,07	-87,74 ± 0,28	0,80
Standardabweichungen wurden direkt durch Programmanpassung erhalten. Messungen erfolgten bei 25 °C und pH 7,0.						
^a Stöchiometrie der Wechselwirkung [mol Ligand / mol CsCBM27-1]						

Nun wurde die Temperaturstabilität und die Abhängigkeit der Entfaltungstemperatur (T_m) des CsCBM27-1 in Anwesenheit von Kalzium durch Änderung des langwelligen UV *Circularen Dichroismus* bei 230 und bei 222 nm bestimmt. Die thermische Entfaltung war irreversibel und sichtbare Aggregate wurden am Ende des Experiments beobachtet. Demzufolge ist eine thermodynamische Bewertung nicht möglich, sondern nur die Bestimmung des T_m – Werts.

Der T_m – Wert des Kalzium-freien CsCBM27-1 in Anwesenheit von 1 mM EDTA war 85,3 °C (Daten nicht gezeigt), während in der Kalzium-gebundenen Struktur eine hohe intrinsische Stabilität gegen thermische Entfaltung mit einem T_m -Wert von 96,8 °C festgestellt wurde. Demzufolge zeigen die hier dargestellten Ergebnisse der Bindungs- und thermischen Entfaltungsexperimente deutlich die strukturelle Funktion des Kalziums in CsCBM27-1 und in verwandten CBMs.

3.11 Einfluss von Temperatur auf die Bindung des Zuckers an CsCBM27-1

Isotherme Titrationskalorimetrie wurde durch Dr. Wolfgang Pfeil bei verschiedenen Temperaturen (15 – 45 °C) durchgeführt, um die Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p) bei Bindung von CsCBM27-1 an Mannohexaose zu bestimmen. Innerhalb des experimentellen Fehlers wurde ein ΔC_p -Wert für Mannohexaose aus dem Verlauf von ΔH gegen die Temperatur von -0,11 kJ mol⁻¹K⁻¹ erhalten. Dieser relative geringe negative Betrag für ΔC_p wurde ebenfalls für andere Zucker – CBM Wechselwirkungen berichtet [12, 74, 85]. Er ist mit einem Gleichgewicht zwischen polaren und apolaren Wechselwirkungen in dem Bindungsereignis assoziiert und ist charakteristisch für eine Bindung, die nicht durch den hydrophoben Effekt dominiert ist [74].

Tabelle 8: Temperatureffekt in der ITC bei der Bindung von CsCBM7-1 an Mannohexaose

T [°C]	$K_a [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]$	$\Delta G [\text{kJ mol}^{-1}]$	$\Delta H [\text{kJ mol}^{-1}]$	$\Delta S [\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}]$	n^a
15	22,1 ± 1,6	-40,5 ± 0,2	-63,1 ± 0,4	-78,3 ± 2,0	1,00
25	9,57 ± 0,4	-40,0 ± 0,1	-64,3 ± 0,3	-81,5 ± 1,4	1,02
35	4,77 ± 0,3	-39,4 ± 0,1	-64,4 ± 0,5	-81,1 ± 2,2	0,93
45	1,64 ± 0,2	-37,9 ± 0,3	-66,7 ± 2,3	-90,6 ± 8,2	0,98

Standardabweichungen wurden direkt durch Programmanpassung erhalten. Messungen erfolgten in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0.

^aStöchiometrie der Wechselwirkung [mol Ligand / mol CsCBM27-1].

Eine Temperaturänderung von 15 °C nach 45 °C resultierte in einer ungefähr 13-fachen Verringerung der Affinität von CsCBM27-1 für Mannohehexaose und war mit einer relativ geringen Änderung in ΔG verbunden (Tabelle 8).

Ein Temperaturoptimum für die Aktivität des C-terminalen katalytischen Moduls der Mannanase 26 (ohne CBMs) des *Caldicellulosiruptor* Stamms Rt8B.4 für lösliches Galactomannan wurde zwischen 60 – 65 °C festgestellt [53]. Überraschenderweise lag dieses Temperaturoptimum niedriger als die Wachstumstemperatur von 70 °C für den *Caldicellulosiruptor* Stamm Rt8B.4. Kürzlich wurde auch die optimale Aktivitätstemperatur für die intakte (volle Länge) modulare Mannanase 26 (siehe Abbildung 4, Seite 24) für lösliches Galactomannan bestimmt, die bei 85 °C lag [Sunna et al. – unpublizierte Ergebnisse]. Da die Mannanase 26 bei höheren Temperaturen katalytisch aktiv ist, ist es daher interessant zu bestimmen, wie sich CsCBM27-1 bei 85 °C Temperatur verhält. Temperaturabhängige Entfaltungsexperimente weisen darauf hin, dass CsCBM27-1 mit einem T_m -Wert von 96.8 °C extrem hitzestabil ist und deshalb oberhalb der Wachstumstemperatur von *Caldicellulosiruptor* gefaltet bleibt. Der Auftrag von $\ln(K_a)$ gegen die Temperatur (Abbildung 19) kann benutzt werden, um den K_a -Wert für 85 °C zu extrapolieren, dem Temperaturoptimum der Aktivität der modularen Mannanase 26. Bei dieser Temperatur wird ein ~170-faches Absinken in der Affinität angenommen, im Vergleich zu 25 °C. Dieser K_a -Wert liegt dicht an den Werten, die für CBMs mit mesophiler Herkunft gefunden wurden [13, 14, 72, 73].

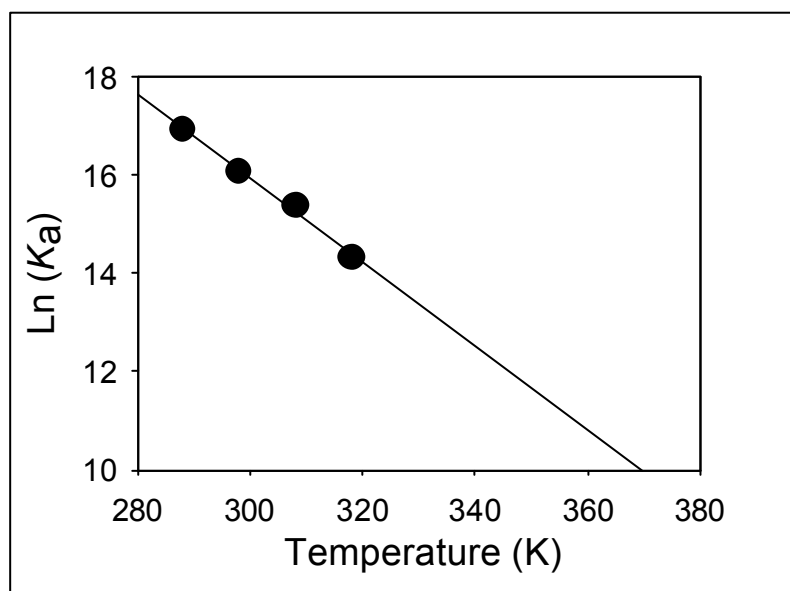


Abbildung 19: Logarithmische Auftragung der K_a -Werte aus Tabelle 8 gegen die Temperatur für die Bindung von Mannohehexaose an CsCBM27-1.

Daher könnten CBMs unterschiedlicher Herkunft (thermophilen und hyperthermophilen Ursprungs) eine hohe Affinität für ihre entsprechenden Substrate entwickelt haben. Kürzlich wurde postuliert, dass die hohe Affinität bei niedriger Temperatur vielleicht erforderlich ist, damit bei der hohen Temperatur am Katalyseoptymum noch ausreichende Affinität zum Substrat vorliegt [10, 75].

3.12 Superfamilie der CBMs

Unser Kooperationspartner Anwar Sunna hat die Zusammenfassung der CBM Familien 4, 16, 17, 22 und 27 zu einer Superfamilie der CBMs vorgeschlagen [25]. Diese Beziehung wurde auf der Grundlage der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz und dem Erhalt zweier konservierter Motive definiert. Diese Motive, die nicht Teil der Liganden-Bindungsstelle sind, könnten eine Art Faltungssignatur innerhalb der Familien der CBMs darstellen. Seit kurzem sind strukturelle Daten von fast allen Vertretern dieser Familien zugänglich, die zeigen, dass alle dem gleichen *b-sandwich*-Faltungstyp entsprechen, dem so genannten *jellyroll*. In der Abbildung 8 sind dreidimensionale Strukturen von Mitgliedern der CBM Familie 4, 17, 22 und 27 gezeigt. Es sind bis jetzt keine strukturellen Daten für die CBM-Familie 16 vorhanden.

In der Abbildung 20 sind der gebundene Ligand und die Position der aromatischen Plattform dargestellt, außer für CBM22-2, für das nur die ligandfreie Struktur vorhanden ist. Interessanterweise haben alle Proteine ein Kalziumion gebunden, welches weit entfernt von der Ligandenbindungsstelle auf der gegenüberliegenden Moleküloberfläche liegt.

Die beiden konservierten Motive liegen in allen vertretenen CBMs benachbart zueinander. Mindestens ein Rest von jedem N- und C-Terminus ist direkt an der oktaedrischen Bindung des Kalziumions (z.B. Rest E12 und D176 in CsCBM27-1 in Abbildung 13, Seite 47) beteiligt.

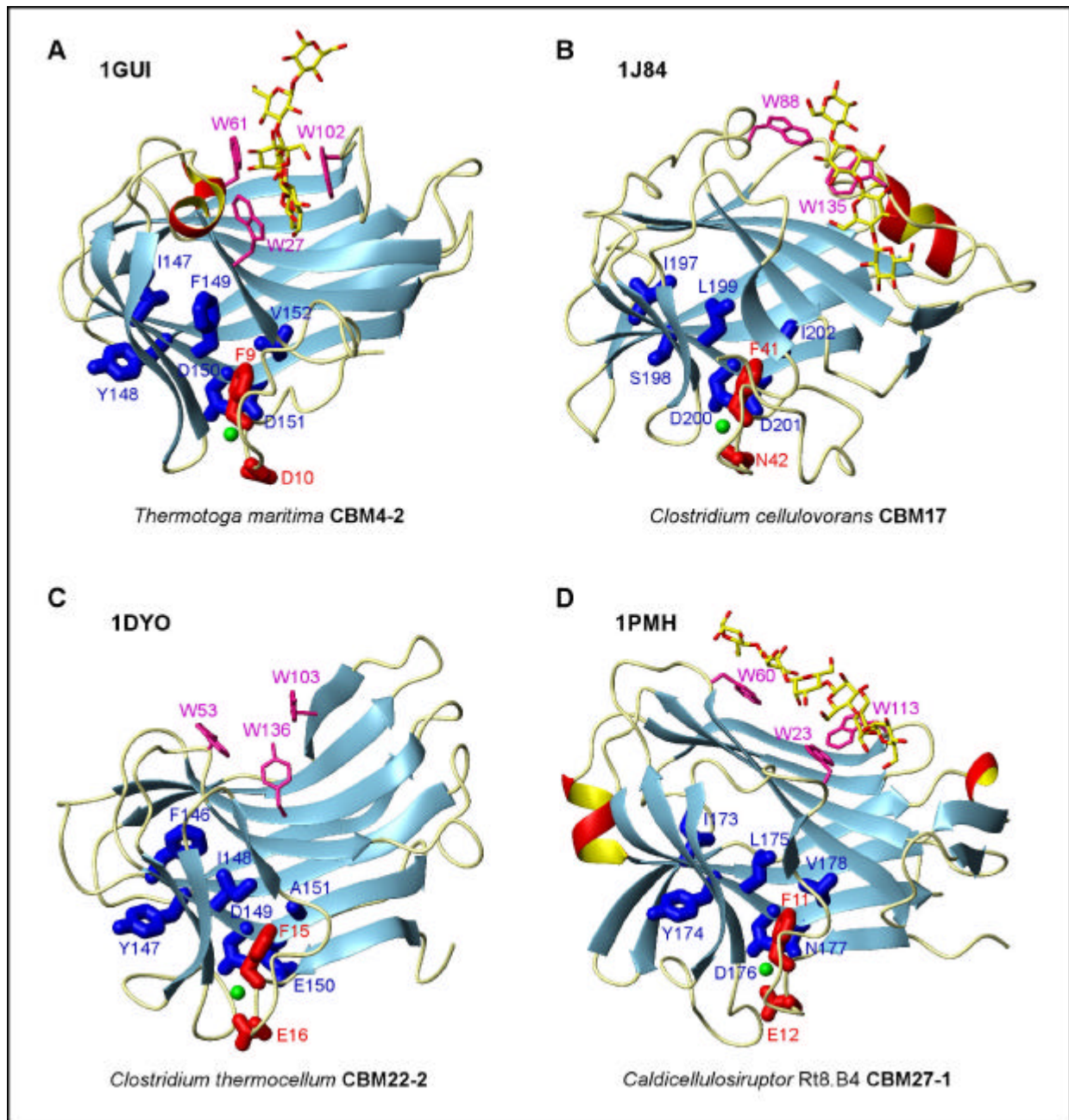


Abbildung 20: Dreidimensionale Strukturen der Vertreter der CBM-Familien 4, 17, 22 und 27. Der gebundene Ligand und die aromatische Plattform sind in gelb und magenta dargestellt. Für CBM22-2 existiert nur die ligandfreie Struktur. Das gebundene Kalziumion ist als grüne Kugel abgebildet, während die Positionen der in der Superfamilie konservierten N- und C-terminalen Motive entsprechend in rot und dunkelblau gezeigt sind.

4. INTERPRETATION UND BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Eine große Anzahl mutmaßlicher CBMs wurden durch Vergleiche der Aminosäuresequenz identifiziert. Jedoch konnte nur für einige die Kohlenhydrat bindende Funktion experimentell gezeigt werden. Die spezifisch β -Mannan bindenden CBMs tragen zu ungefähr 10% zur Gesamtzahl der CBM Familien in der CAZY Datenbank bei. Während es bereits ausführliche strukturelle Studien über den Mechanismus der Ligandenbindung durch die Mannan bindenden Lectine gibt, wird der Mechanismus der Zellwandpolysaccharidbindung durch die β -Mannan bindenden CBMs erst seit kurzem studiert [18, 38].

Die hier untersuchte hochaufgelöste Kristallstruktur des ungebundenen und Mannohexaose gebundenen CsCBM27-1 erlaubt weitere Einblicke in die Interaktion β -Mannan bindender CBMs mit ihren entsprechenden Liganden. CsCBM27-1 zeigt ein typisches *b-sandwich jelly-roll* Motiv mit einer Ligandbindungsfurche und einem gegenüberliegend gebundenem Kalziumion. Diese Anordnung ist ähnlich den Topologien, die für andere CBM-Familien gefunden wurden [13, 15, 16, 75]. Durch die hier präsentierten strukturellen Daten (*jellyroll*-Motiv, Position des Kalziums und Ort der ausgedehnten Bindungsfurche) zusammen mit der beobachteten Konservierung der strukturellen Position der konservierten Sequenzmotive kann die Definition der CBM-Familien 4, 16, 17, 22 und 27 zu einer Superfamilie bekräftigt werden.

Die Rolle des Kalziumions für die Struktur des CsCBM27-1 und der verwandten CBMs thermophilen Ursprungs wurde durch Bindungsstudien und temperaturabhängige Entfaltungsexperimente bestätigt. Kalzium scheint eine wichtige Rolle für den Erhalt der strukturellen Integrität von CsCBM27-1 bei hohen Temperaturen zu spielen, aber es hat keinen Einfluß auf die Assoziationskonstanten von CsCBM27-1 bei der Bindung von Mannohexaose. Bei extremen Temperaturen, wie z.B. bei 85 °C, sinkt die Assoziationskonstante für Mannohexaosebindung an CsCBM27-1, und die Bindungswerte gleichen denen ihrer mesophilen Orthologen. Die Kompensation des Affinitätsverlustes während der Enzymreaktion des modularen Proteins bei hohen katalytischen Temperaturen weist auf eine mögliche

evolutionäre Anpassung von CBMs thermophilen Ursprungs hin. Eine weitere mögliche Strategie der Kompensation des Verlustes an Affinität besteht durch die Multiplizität der CBMs, die innerhalb thermophiler Glycosidhydrolasen gefunden wurden. Folglich könnte durch die gemeinsame Bindung mehrerer CBMs in den modularen Enzymen der Verlust an Bindungsstärke bei hohen Temperaturen ausgeglichen werden [10].

Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle und funktionelle Vielfalt der CBMs und das Zusammenspiel der einzelnen Module in dem gesamten enzymatischen System zu verstehen. Solche Studien wären von besonderer Relevanz für das Pflanzensystem, aus dem eine große Anzahl an vermeintlichen modularen Enzymen hervorging. Es wird vermutet, dass weitere Klassen der CBM-Module eine Rolle in der Zellwandausdehnung von Pflanzen spielen.

Weitere strukturelle Untersuchungen der kompletten Mannanase²⁶ aus *Caldicellulosiruptor*, Stamm Rt8B.4, würden Einsicht in die Anordnung der nicht-katalytischen zu katalytischen Einheiten bringen und so die Funktionsweise des Proteins eventuell deutlicher erklären. Selbst nur die Struktur des zweiten CsCBM27 Moduls würden interessante Erkenntnisse bringen. Im Fall der *Caldicellulosiruptor*, stamm Rt8B.4, β -Mannanase 26 bindet das erste Zucker-bindende Modul (CsCBM27-1) streng an LBG-Galaktomannan (β -1,4-D-Mannose Polysaccharide verbunden mit α -1,6-Galaktose im Verhältnis 4:1) und in geringerem Ausmaß an β -Glucan der Gerste, CM-Pachyman und HE-Zellulose. Das zweite Zucker-bindende Modul (CsCBM27-2) zeigt jedoch alleine keine Affinität zu irgendeinem Liganden der an CsCBM27-1 bindet. Beide Module haben eine Sequenzidentität von 31,4% zueinander. Strukturelle Unterschiede sind durch die relativ geringe Sequenzübereinstimmung anzunehmen. In einem Sequenzalignment, durchgeführt mit dem Programm LALIGN [86] (Daten nicht gezeigt) wurden insbesondere die Positionen der Tryptophane betrachtet die für die Substratbindung essentiell sind. An der Tryptophanposition 23 in CsCBM27-1 ist ein Serin in CsCBM27-2 positioniert. Tryptophan 60 in CsCBM27-1 ist gegenüberliegend mit einem Phenylalanin in CsCBM27-2. Gegenüber dem dritten Tryptophanrest 113 in CsCBM27-1 ist in dem Alignment auch ein Tryptophan in CsCBM27-2 lokalisiert. Diese Variationen bezüglich der Positionen und Art der aromatischen Aminosäurereste könnte die mangelnde Affinität von CsCBM27-2 zu den oben genannten Substratpartnern zusätzlich erklären.

III. Die hexamere ATPase HP0525 aus *Helicobacter pylori*

1. EINLEITUNG

1.1 Die bakterielle Konjugation

Die Konjugation ist ein weit verbreiteter Plasmid- oder Transposon-kodierter Prozess durch welcher DNA von einer bakteriellen Donorzelle in eine Empfängerzelle überführt wird. Lederberg & Tatum (1946) hatten diesen Prozeß erstmals bei *Escherichia coli* K12 beschrieben [87]. Der F-(*fertility*)-Faktor, ein extrachromosomales, ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid) wurde später als Verursacher dieses Prozesses identifiziert [88, 89]. Später wurden weitere konjugative Plasmide und konjugative Transposons in Bakterien beschrieben [90, 91, 92, 93]. Die Konjugation ist jedoch nicht auf Bakterien beschränkt. Es wurde auch ein konjugatives Plasmid bei Archaea entdeckt [94]. Der Verlauf der bakteriellen Konjugation durch die Zellhülle Gram-negativer Zellen ist zum größten Teil von den Erkenntnissen über den F-Faktor abgeleitet und wird durch eine supramolekulare Struktur, den *mating pair formation* (Mpf)-Komplex, vermittelt. Im ersten Schritt wird der Zellkontakt der Donorzelle mit dem enthaltenden konjugativen Plasmid zu dem plasmidfreien Rezipienten ausgebildet. Die Vermittlung des Zellkontakts erfolgt durch das extrazelluläre Filament, dem sogenannten konjugativen Pilus. Die zur Pilusbildung entscheidenden Proteine werden dem Mpf-System zugeordnet. Das Mpf-System ist ein Membran-durchspannender Multikomponenten Komplex.

Viele Pathogene benutzen Sekretionssysteme, deren Untereinheiten evolutionär denen des Mpf-Komplexes verwandt sind. Zum Beispiel *Agrobacterium tumefaciens*, ein Phytopathogen, das Tumorstadium in infizierten Pflanzengewebe induziert, benutzt solch einen Mechanismus, um die onkogene T-DNA und verschiedene Effektorproteine in den Kern der Pflanzenzellen zu transportieren. *Helicobacter pylori*, Verursacher von Magen- und Zwölffin-

gerdarmgeschwüren, benutzt ein verwandtes System um das CagA-Protein in Säugetierzellen zu überführen, jedoch ohne Einbeziehung eines Pilus. Von der Pilus-vermittelten Kontaktaufnahme geht wahrscheinlich ein *trigger*-Signal aus, welches das plasmidkodierte **DNA transfer und replication** (Dtr)-System stimuliert und den zu transferierenden Einzelstrang in einem *rolling circle replication* (RCR)-Prozess ablöst. In 5'-3'-Richtung wird dann der T-Strang (*transferring strand*) repliziert und transferiert. Es ist jedoch unklar wie und durch welche Transportpore der Einzelstrang durch die insgesamt vier Zellmembranen und durch zwei Peptidoglycanschichten des Donors und des Rezipienten gelangt. Es gibt so genannte Kopplungsproteine, die die zwei Hauptkomponenten der Maschinerie (RCR und Typ IV Sekretion) verbinden und aktiv den DNA-Transport aus dem Bakterium vermitteln. Der komplementäre Strang des nun in den Rezipienten transferierten Einzelstranges wird durch einen *lagging strand*-Mechanismus synthetisiert. Es liegen am Ende des konjugativen DNA-Transfers zwei Zellen vor, die das negativ superhelikale Plasmid enthalten und so ihrerseits als Donorzellen wirken können.

1.1.1 Kopplungsproteine

Die Kopplungsproteine verbinden das Relaxosom mit dem Membran-Transporter und sind in allen konjugativen Systemen zu finden. Sie sind nicht an der Pilusassemblierung und nicht in DNA-Prozessierungsreaktionen involviert [95, 96, 97, 98]. Die am besten charakterisierten Kopplungsproteine sind das TrwB des IncW-Plasmids R388, TraD des IncF-Plasmids F, TraG des IncP-Plasmids RP4 und VirD4 des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids. Sie vermitteln die Verankerung an die innere Membran da sie transmembrane Regionen sowie cytoplasmatische Domänen besitzen und somit eine gute Verbindung zwischen dem cytoplasmatischen System und einem Membrankomplex darstellen [99, 100, 101, 102]. Es wurden konservierte „Walker“-Motive in ihrer Sequenz gefunden, aber es wurde bis jetzt von keiner NTPase-Aktivität berichtet. Da sie aber dieses für ATPasen typische Motiv besitzen, wird vermutet, dass sie ATP-Hydrolyse als eine Energiequelle benutzen, um als eine Art Motor zu funktionieren. Die Kopplungsproteine scheinen hauptsächlich mit Systemen assoziiert zu sein, die DNA transferieren. Daher wird angenommen, dass sie eine mögliche spezifische Rolle bei dem DNA-Transport spielen. Sie sind in der Lage einzel- sowie doppelsträngige DNA unspezifisch zu binden [103].

1.2 Die Rolle des Typ IV Sekretionssystems

Virulenz und Pathogenese in Gram-negativen Bakterien ist teilweise von makromolekularen Sekretionssystemen (Typ I – IV) abhängig, die bezüglich des Transportes von Proteinen und/oder Protein-DNA-Komplexen vom bakteriellen Cytosol zur Wirtzelle durch das bakterielle Doppelmembransystem spezialisiert sind [104]. Diese Sekretionssysteme sind Multiproteinkomplexe, bestehend aus löslichen und Membran-assoziierten Proteinen.

Das Typ IV Sekretionssystem ist sehr vielseitig. Es ist fähig, DNA-Protein-Komplexe in andere Bakterien, Hefen und Pflanzen zu transportieren. Das VirB-System der agrobakteriellen Spezies ist speziell für den Transfer von T-DNA hinein in Pflanzenzellen ausgelegt. Die Proteine des VirB-Systems scheinen die einzigen zu sein, die in dem Export aus dem Cytoplasma durch die zwei Membranen der agrobakteriellen Zellhülle beteiligt sind.

Viele menschliche Pathogene, wie die Magengeschwüre verursachenden *Helicobacter pylori* und die Lungenentzündung hervorrufenden *Legionella pneumophila* kodieren für direkt an der Virulenz beteiligte Typ IV Sekretionssysteme [105]. Die meisten Typ IV Sekretionssysteme in Pathogenen scheinen Proteintransporter zu sein. Das eigentliche Substrat ist jedoch unbekannt, außer für den die *cag* Pathogenitätsinsel tragenden *Helicobacter pylori* Typ I Stamm, der für ein Typ IV Sekretionssystem kodiert, welches den Transport des 145 kDa Proteins CagA in eukaryotischen Zellen leitet [106]. Es wird angenommen, dass die Relaxase zusammen mit der DNA als eine Art Pilotprotein in die Empfängerzelle überwechselt und dort den endgültigen DNA-Strangtransfer durchführt. Somit würde die Relaxase das wahre Substrat des konjugativen Typ IV Sekretionssystems darstellen [107].

Die Sekretionssysteme schließen essentielle NTPasen mit ein (hauptsächlich ATPasen), die die Assemblierung dieser Sekretionssysteme und/oder den Substrattransport vorantreiben. Der Exportprozess von Proteinen und/oder Protein-DNA-Komplexen scheint durch ATP-Hydrolyse angetrieben zu sein. Zwei ATPasen, die VirB4 und VirB11, lokalisiert an der cytoplasmischen Seite der inneren Membran, könnten den Prozess antreiben.

Es ist ebenfalls unklar, warum Bakterien multiple Mechanismen für die Sekretion von extrazellulären Proteinen besitzen, ein Prozess der oberflächlich sehr ähnlich erscheint. Auch wenn verschiedene Sekretionssignalwege in demselben Bakterium vorhanden sind, wird der Sortierungsprozess infolge der präzisen Erkennung von spezifischen Signalen der zu sekretierenden Proteine mit hoher Genauigkeit von der Sekretionsmaschinerie durchgeführt. Danach wird die Ausschleusung dann den spezifischen Sekretionssignalwegen überlassen.

1.3 HP0525 ist eine VirB11 ATPase

Die VirB11-ATPasen sind eine Subklasse der PufE-ähnlichen ATPasen [108]. Während die absolute Erforderlichkeit dieser ATPasen für das eigentliche Funktionieren ihrer entsprechenden Sekretionssysteme erwiesen ist, sind wichtige Fragen bezüglich ihrer spezifischen Rolle und Funktionsweise unbeantwortet [109]. Ihre Rollen können von Organismus zu Organismus variieren, abhängig von dem zu vermittelndem Transport. Drei Familien von vermeintlichen ATPasen sind mit dem Typ IV Sekretionssignalweg assoziiert. Eine besteht aus der TraG-Familie der in Absatz 1.1.1 beschriebenen Kopplungsproteine. Die zweite sind aus den Homologen des Proteins VirB4 aus *Agrobacterium tumefaciens* zusammengesetzt. Diese Proteine sind weit verbreitet unter den Typ IV Systemen und manchmal in zwei oder mehr Kopien vorhanden. Die zweite ATPase-Familie könnte Informationen umwandeln, in der Form von ATP-induzierten konformationellen Änderungen quer durch die cytoplasmische Membran hin zu extracytoplasmatischen Untereinheiten [110].

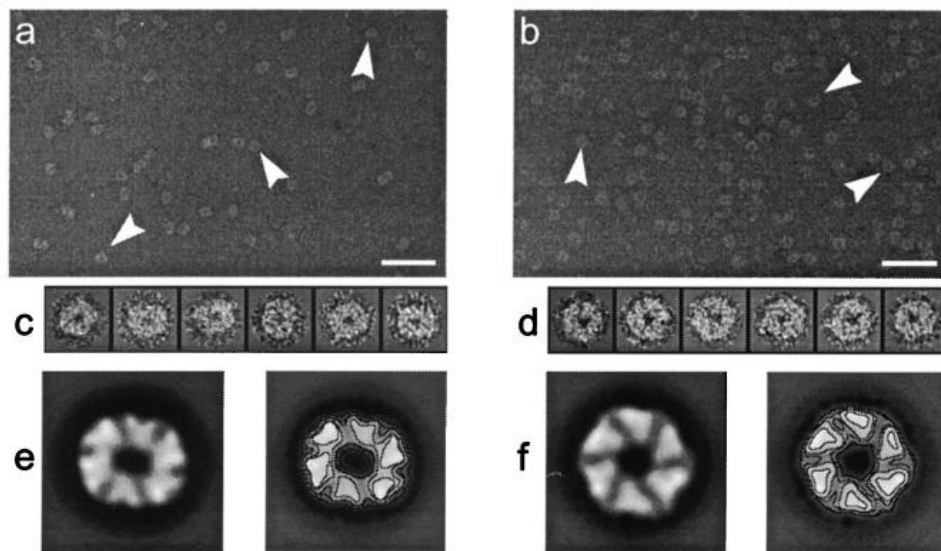


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der negativ gefärbten TrbB- (a) und HP0525- (b) Proteine in Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP. Die Pfeile zeigen auf die charakteristischen Partikel n dem selektierten Feld. Die Balken repräsentieren 50 nm. Zwei Reihen mit Aufnahmen, die in der zwei-dimensionalen Analyse benutzt wurden sind in c (TrbB) und d (HP0525) gezeigt. Globale, gemittelte Bilder sind in e für TrbB und in f für HP0525 gezeigt. Sie wurden bis zur endgültigen Auflösung von 14 Å in beiden Fällen gefiltert. Die Rahmengröße der Bilder in der Bilderreihe (c und d) und für die gemittelten finalen Bilder beträgt 20,0 × 20,0 nm. Abbildung aus Publikation von Krause, S. et al. [112] entnommen.

Zu der dritten ATPase-Familie zählt die durch das RP4 Plasmid codierte VirB11-ATPase TrbB, die in der Biogenese des Pilus involviert ist [111]), das Protein VirB11 von *Agrobacterium tumefaciens* (Prototyp für das Typ IV Sekretionssystem, das für den Transfer der T-DNA verantwortlich ist, und die ATPase VirB11 von *Helicobacter pylori*, die vielleicht direkt an dem Transport von Proteinen durch die innere Membran beteiligt ist.

Diese ATPasen assoziieren gewöhnlich schwach, aber peripher mit der cytoplasmatischen Membran. Biochemische Studien zeigten eine homooligomere Quartärstruktur dieser ATPasen. Für TrbB des Plasmids RP4, TrwD des Plasmids R388 und die *cag*-Pathogenitätsinsel aus *Helicobacter pylori* HP0525 wurde durch Elektronenmikroskopie (Abbildung 21) die Zusammenlagerung zu homohexameren Ringen mit ~ 12 nm äußerem Durchmesser und ~ 3 nm Durchmesser einer zentralen Region mit geringer Elektronendichte gezeigt [112, 113]. Die Ringe wurden durch Zugabe von ATP stabilisiert und die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von Phospholipiden stimuliert, welches eine Interaktion mit der Membran vermuten lässt.

Die erforderlichen Nukleotide variieren von Protein zu Protein. Die potenzielle Rolle der VirB11 Proteine berücksichtigt, dass diese Proteine zumindest teilweise mit der inneren Membran assoziiert und an der zytoplasmischen Seite der inneren Membran lokalisiert sind [102, 114, 115]. Diese Strukturen lassen vermuten, dass VirB11-Proteine vielleicht aktiv an dem Transport von Substraten beteiligt sind.

In dieser Arbeit wird die Struktur der VirB11-ATPase HP0525 von *Helicobacter pylori* vorgestellt. Das Magengeschwür verursachende Eubakterium *Helicobacter pylori*, verursacht wahrscheinlich die am häufigsten vorkommende chronische bakterielle Infektion beim Menschen, anzutreffen bei fast der Hälfte der Weltpopulation [116]. Die Besiedlung der Magenschleimhaut mit dem Bakterium ist mit chronischer aktiver Gastritis verbunden und ist für weit massivere gastrische Erkrankungen, darunter die chronische und schleimhautverbundene Lymphknotenschwellung (gastric lymphoma of ~~mucosa-associated~~ lymphoid tissue (MALT)) verantwortlich [117, 118]. Ein Substrat für die Sekretion ist ein Protein der Größe 145 kDa, CagA [106, 119, 120, 121]. CagA ist durch die Cag-Pathogenitätsinsel in *Helicobacter pylori* codiert und wird durch das Typ IV Sekretionssystem in die Magen- oder Epithelzellen injiziert. Dort injiziert, wird CagA Tyrosin-phosphoryliert und greift wahrscheinlich in Signalübertragungswege der Wirtszellen ein. Die Kristallstruktur soll Licht in die Funktion von HP0525 bringen und eine Grundlage zum Entwickeln von Medikamenten gegen Geschwürkrankheiten bilden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Proteinexpression und Reinigung

2.1.1 Allgemeine Methoden

Bestimmung der Proteinkonzentration

Anhand der Absorption bei 280 nm (mit dem Spektralphotometer DU 7400 der Firma Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die hierzu verwendeten Extinktionskoeffizienten wurden von dem Program ProtParam aus der Aminosäuresequenz mit der Methode von Gill und von Hippel [55] bestimmt, in der die Extinktionskoeffizienten der Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein nach Häufigkeit für eine bestimmte Wellenlänge addiert wird. Der Extinktionskoeffizient für HP0525 für die Wellenlänge von 280 nm beträgt $23.380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Gele wurden nach der Standardmethode nach Laemmli [54] mit 15 % Acrylamidanteil hergestellt. Vor dem Probenauftrag wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt und wenige Minuten bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Die Elektrophorese wurde zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei 100 V und für die Auftrennung bei 200 V durchgeführt. Die getrennten Proteinbanden wurden mittels Färbung mit *Coomassie Blue* sichtbar gemacht. Überschüssige Färbung des Gels wurde durch Lagerung des Gels über mehrere Stunden unter Schwenken in Entfärbelösung (Methanol/Essigsäurelösung) entfernt.

Herstellung kompetenter *E. coli* B834 (DE3) Zellen

Die gesamte Herstellung erfolgte, falls nicht anders beschrieben, auf Eis. 500 µl einer Übernacht in LB-Medium angezogenen *E. coli* B834 (DE3) Vorkultur wurden zum Animpfen von 250 ml LB-Medium genommen. Die Hauptkultur schüttelte für 2-3 Stunden bei 37 °C bis

eine optische Zelldichte (OD) bei 600 nm von 0,3 – 0,4 erreicht wurde. Nach Zentrifugation der Zellen bei 3000×g für 5 min (4 °C) wurde das Zellpellet in 5 ml TFB1 Puffer resuspendiert und dann in 70 ml TFB1 Puffer für 2 Stunden im Eisbad inkubiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren der Zellen, siehe oben, wurde das Zellpellet in 10 ml TFB2 gelöst, in 200 µl Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren für die Aufbewahrung bei -70 °C.

TFB1 – Puffer

1,2%

1%

0,01 M

0,03 M

15%

RbCl

MnCl₂CaCl₂

MOPS pH 7.0

K-Acetate

Glycerin

TFB2 -Puffer

1,2%

0,075 M

0,01 M

15%

2.1.2 Natives HP0525

2.1.2.1 Klonierung und Transformation

Die DNA der ATPase HP0525 wurde von den Kooperationspartnern Sabine Krause und Erich Lanka, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, in den Expressionsvektor pWP4760 kloniert [112]. Das Plasmid wurde durch die Kooperationspartner in den *E. coli* K12 Stamm SCS1 (Stratagene) transformiert. Nach Erhalt eines Glycerinstocks konnte das HP0525-Protein wie folgt exprimiert werden.

2.1.2.2 Expression, Zellernte und -aufschluss

Die aerobe Zellanzucht erfolgte durch Animpfen einer Vorkultur von YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillinzusatz. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in Schüttelkolben auf einem Rundschüttler inkubiert. Für die Hauptkultur wurde 1 Liter YT-Medium mit 10 ml Vorkultur + 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD = 0.8 bei 600 nm Wellenlänge unter Schütteln bei 37 °C herangezogen. Die Induktion der

Genexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Zellen wurden für weitere 4 Stunden bei 37 °C und Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Die Zellernte wurde bei einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 1,6$ durch Zentrifugation der Zellkultur bei 5000 rpm für 10 Minuten vorgenommen. Das entstandene Zellpellet (3 g Nassgewicht) wurde in 5 ml Spermidinmix (s.u.) gelöst. Für die Zwischenlagerung wurden die resuspendierten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Für den enzymatischen Zellaufschluss wurden die in Spermidinmix gelösten Zellen in 100 ml Lysemixlösung aufgetaut und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des viskosen Lysats bei 19.000 rpm für 45 min bei 4 °C. Das Protein im Überstand wurde aufgehoben und stellte das Ausgangsmaterial für die Reinigung dar.

YT – Medium

1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
0,1% (w/v) Glucose
25 mM MOPS (pH 8,0)
0,025 mg/ml Thiamin-HCl

Spermidinmixlösung

200 mM NaCl
2 mM EDTA
20 mM Spermidin

Lysemix

0. M NaCl
0.1 M Tris-HCl pH 7,5
5% (w/v) Saccharose
0,25% (w/v) Brij 58
0,2 mg/ml Lysozym

2.1.2.3 Proteinreinigung

Die Reinigung von HP0525 erfolgte in vier Schritten: Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustausch-Chromatographie, Hydroxyapatit-Chromatographie und Gelfiltration.

1. Ammoniumsulfatfällung

Das Protein aus dem abzentrifugierten Überstand aus Kapitel 2.1.2.2 wurde unter langsamem Rühren durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 60% (w/v) Ammoniumsulfat bei 4 °C gefällt [122]. Das gefällte Protein (Präzipitat) wurde mittels Zentrifugation für 20 min bei 30000 rpm (4 °C) als Pellet gesammelt und in 30 ml Puffer A gelöst. Nun erfolgte eine Dialyse für 90 min im Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 10.000 Dalton) gegen den gleichen Puffer. Anschließend wurde dann gegen Puffer B für 30 min dialysiert.

Puffer A

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 0,1 M NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA
 10% (v/v) Glycerol
 0,01% (w/v) Brij 58

Puffer B

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 0,1 M NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA
 1% (v/v) Glycerin
 0,01% (w/v) Brij 58

2. Anionenaustausch - Chromatographie

Die gegen Puffer B dialysierte Proteinlösung wurde für den Auftrag auf die Anionenaustauschersäule MonoQ der Firma Amersham Pharmacia biotech, Freiburg (1 ml Bettvolumen) im Volumenverhältnis 1:1 mit Puffer C verdünnt. Volumina bis maximal 40 ml verdünnter Proteinlösung wurden auf die in Puffer C equilibrierte Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Das Protein wurde mit einem linear ansteigenden Gradienten von 0,1 M – 0,5 M NaCl in Puffer D über 40 Säulenvolumen mit einer Flussrate von 1ml/min eluiert. Die Chromatographieexperimente wurden an einem ÄKTA-Explorer Gerät der Firma Amersham Pharmacia biotech, Freiburg, durchgeführt. Die vereinigten HP0525 enthaltenden Proteinfractionen wurden gegen Puffer E über Nacht bei 4 °C dialysiert (10.000 Da Ausschlussgrenze).

Puffer C

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 20 mM NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA

Puffer D

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 M NaCl
 1 mM DTT
 1 mM EDTA

Puffer E

20 mM Kaliumphosphat pH 6,8
 1 mM DTT
 2,5 % (v/v) Glycerin

3. Hydroxyapatit – Chromatographie

Die dialysierten Proteinfractionen wurden auf eine Hydroxyapatitsäule mit 7 ml Bettvolumen aufgetragen. Vorher wurde die Säule jedoch zuerst in Puffer F und anschließend in Puffer G equilibriert. Die Flussrate für den Elutionslauf betrug 0,5 ml/min, und es wurden 2,5 ml

Fraktionen wurden gesammelt. Eluiert wurde mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20 mM – 500 mM Kaliumphosphat. Die entsprechenden Fraktionen wurden nach Beurteilung der SDS-PAGE vereinigt und durch Dialyse gegen 20% PEG 20000 Zusatz in Puffer C konzentriert.

Puffer F

500 mM Kaliumphosphat pH 6,8

50 mM KCl

1 mM DTT

5% (v/v) Glycerin

Puffer G

20 mM Kaliumphosphat pH 6,8

50 mM KCl

1 mM DTT

5% (v/v) Glycerin

4. Gelchromatographie

Bis zu 2 ml der konzentrierten Fraktionen aus der Hydroxyapatit-Chromatographie wurden auf eine Superdex 75 (Amersham Pharmacia biotech, Freiburg) Gelsäule (16 / 60) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit Puffer H equilibriert, und die Proteinelution erfolgte bei einer Flussrate von < 2 ml / min. Dieser Reinigungsschritt erfolgte am ÄKTA-Gerät der Firma Amersham Pharmacia biotech, Freiburg. Die HP0525 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ausfindig gemacht, vereinigt und durch Verwendung eines Ultra-Zentrifugalfilters (Amicon) mit 10.000 Da Ausschlussgrenze der Firma Millipore konzentriert.

Puffer H

20 mM Tris-HCl pH 7,5

0,1 M NaCl

1 mM DTT

1 mM EDTA

2.1.3 Selenomethionin-substituiertes HP0525

2.1.3.1 DNA-Isolierung und Transformation

E. coli K12 SCS1 Zellen mit dem Plasmid pWP4760:HP0525 (Herstellung in [112] beschrieben) wurde in 3 ml YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillinzusatz für 3 Stunden bei 37 °C unter

Schütteln angezogen. Die Isolation der DNA erfolgte durch eine Minipräparation mit einem System (Kit) der Firma QIAGEN laut Herstellerangaben. Die Transformation erfolgte in kompetente Methionin-auxotrophe *E. coli* B834 (DE3) Zellen. Hierzu wurden 100 µl Zellen auf Eis aufgetaut und 100 - 200 ng pWP4760:HP0525 Plasmid zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Inkubation des Transformationsansatzes für 30 Minuten auf Eis wurden sie einer Hitzeschocktransformation für 45 Sekunden bei 42°C unterzogen. Unmittelbar danach wurden die Zellen bis zu 5 Minuten lang auf Eis inkubiert, in 1 ml LB –Medium überführt und für 1 Stunde unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. 100 µl Zellsuspension wurden auf NMM-Agarplatten (s. u.) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

NMM – Agar

1 mM Magnesiumsulfat
87 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat
9,4 mM Tri-Natriumcitrat
20 mM Ammoniumchlorid
32 mM Natrium-di-Hydrogenphosphat
50 mM Glucose
15 g/l Agar
10 mg/l Thiamin
10 mg/l Biotin

2.1.3.2 SeMet- HP0525 Expression, Zellernte und –aufschluß

Für die Expression von SeMet-HP0525 wurde eine Kolonie von der NMM-Agarplatte (siehe Absatz 2.1.3.1) in 1 ml von bei Budisa et al. [56] beschriebenem New Minimal Medium (NMM) ohne Selenomethionin- und Methionanteil überführt und für 4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Zellen wurden in einer 30 ml NMM-Vorkultur (mit M9 Salzen ergänzt, alle regulären Aminosäuren (50 mg/l) außer Methionin, 10 mg/ml Thiamin und Biotin, 20 mM Glucose, 1 mg/l FeCl₃ und CaCl₂, 1 µg/l CuCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, Na₂MoO₄) mit einer Mixtur aus 80% Selenomethionin und 20% Methionin (100 µg/ml Ampicillin) versetzt. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C wurde eine 8 Liter Hauptkultur 1: 100 mit der Vorkultur angeimpft. Das NMM-Medium glich dem der Vorkultur, jedoch mit 100% Selenomethioninzugabe. Die Zellen wuchsen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} = 0,4 - 0,8,

bevor die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Nach ~ 12 Stunden erfolgten die Zellernte und der Zellaufschluss wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben.

2.1.3.3 Reinigung des SeMet-HP0525

Für die Proteinreinigung wurden weitgehend die gleichen Methoden wie für das native Protein HP0525 (siehe II.2.1.1, Seite 26) angewendet. Hier sind nur die Abweichungen von den Protokollen in 2.1.2.3 erläutert. Ein genereller Unterschied ist, dass die DTT-Konzentration in den Puffern von 1 mM auf 9 mM erhöht wurde. Für die Dialyse des Überstands nach der Fällung mit 60 %igen Ammoniumsulfat wurde Puffer I verwendet. Der zweite Reinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie wurde an einer ResourceQ Säule (1 ml Bettvolumen) durchgeführt. Die ResourceQ Säule wurde mit Puffer J equilibriert, und es wurde zur Elution ein linearer Gradient über 32 Säulenvolumina von 20 mM – 1 M NaCl mit Puffer K eingestellt.

Puffer I

20 mM Tris-HCl pH 7,5
0,1 M NaCl
9 mM DTT
1 mM EDTA
2,5% (v/v) Glycerin
0,01% (w/v) Brij58

Puffer J

20 mM Tris-HCl pH 8,5
20 mM NaCl
9 mM DTT
1 mM EDTA

Puffer K

20 mM Tris-HIL pH 8,5
1 M NaCl
9 mM DTT
1 mM EDTA

2.2 Kristallisation von nativem und Selenomethionin (SeMet)-substituiertem HP0525

Gereinigtes natives und SeMet substituiertes HP0525 wurde für die Kristallisation nach der Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen bei 20 °C eingesetzt. Dazu wurde 1 µl Protein mit 1 µl Reservoirlösung auf einem silikonisierten Deckgläschen gemischt und dieses umgekehrt luftdicht auf das Reservoir gelegt. Als Reservoirlösungen wurden die kommerziell

erhältlichen Kristallisationslösungen des Hampton Screens I und II von Hampton Research Corp., Laguna Niguel, USA mit einem Volumen von 800 ml verwendet. Durch Diffusion über die Dampfphase stellte sich ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Reservoir und dem hängendem Tropfen ein. Zur Optimierung der Kristallgröße wurden die Tropfengröße, die Konzentration des Präzipitanten und der pH-Wert variiert.

2.3 Röntgendiffraktionsexperimente

Viele native Kristalle, hexagonaler Morphologie, wurden auf Diffraktionsqualität an dem hauseigenem Rigaku-Generator RU H2B mit $3 \times 0,3$ mm Fokus mit Kupfer-Drehanode und einem MAR345-Röntgendetektor (*Image-Plate*, MARResearch, Norderstedt) mit MaxFlux-System zur Monochromatisierung und Kollimierung des Strahls getestet. Die in einer Nylon-schlinge suspendierten Kristalle wurden in einen Stickstoffstrom von 110 K positioniert. Von dem besten Kristall wurde ein nativer Datensatz bei 100 K an dem MAR345-Detektor am Messplatz BW7B der EMBL-Außenstelle bei DESY, Hamburg, gemessen. Die bei der Wellenlänge $\lambda = 0,8428 \text{ \AA}$ gemessenen Diffraktionsdaten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK prozessiert und skaliert [60, 61].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Proteinexpression und Reinigung

3.1.1 Natives HP0525

Natives Protein HP0525 konnte in *Escherichia coli* rekombinant in ausreichenden Mengen für die Strukturanalyse exprimiert (Abbildung 22a) und gereinigt werden. Durch den ersten Reinigungsschritt mittels Ammoniumsulfatfällung konnten schätzungsweise 30% der *E. coli* Proteine als „Verunreinigung“ abgetrennt werden. HP0525 wurde bei der Fällung mit Ammoniumsulfat bis 60% Sättigung mit ausgefällt und lag nach Zentrifugation im Pellet vor, welches vor dem nächsten Reinigungsschritt wieder in Lösung gebracht wurde. Der zweite Reinigungsschritt über die Anionenaustauschersäule konnte die Abtrennung (Reinigung) von HP0525-Protein von Fremdproteinen aus *E. coli* weiter effizient verbessern (Abbildung 22 b, c). Es lag jetzt nur noch näherungsweise 10 -15 % Verunreinigung vor.

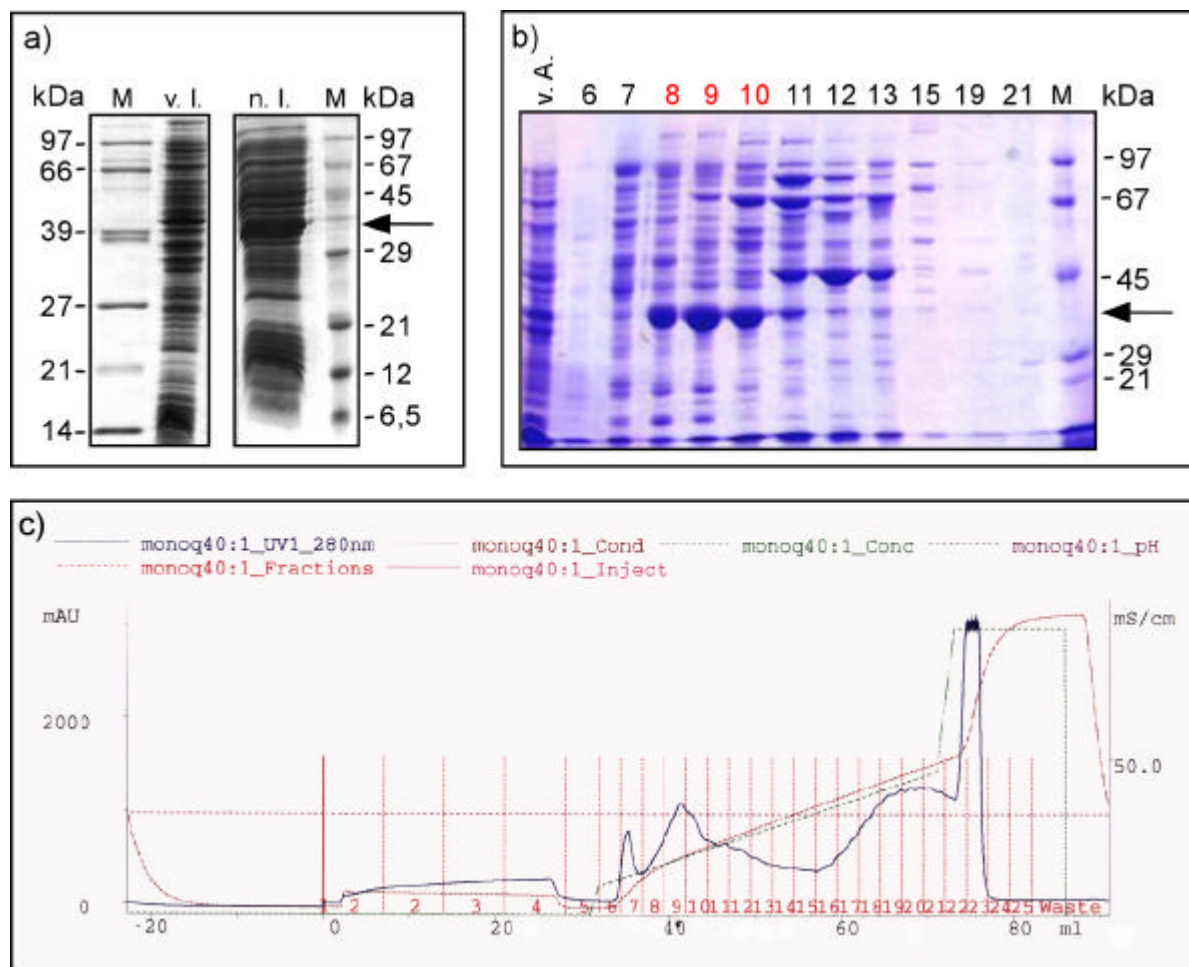


Abbildung 22: Expression und Proteinreinigung durch Ionenaustauschchromatographie. In dieser Abbildung sind in den SDS –Gelen die Referenzproteinspuren mit M gekennzeichnet und jeweils an der Seite mit den entsprechenden Größen in (kDa) angegeben. Pfeile zeigen die Position des Proteins HP0525 für alle Spuren an. a) 15 %ige diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese von einem Aliquot Zellen vor Induktion (Spur v. l.) und nach Induktion (Spur n. l.) b) SDS-Gel der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie an MonoQ-Sephrose. Die Nummern beziehen sich auf die entsprechenden Fraktionen im Chromatogramm (c). Rot markierte Nummerierung zeigt die Fraktionen an, die für die weitere Reinigung vereinigt wurden. In der mit v. a. (vor Auftrag) gekennzeichneten Spur, wurde ein Aliquot der Proteinprobe vor der Reinigung über MonoQ-Säule zum Reinigungsvergleich aufgetragen. c) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie. Die schwarze Linie entspricht der Absorption bei 280 nm, die grüne gestrichelte Linie zeigt den NaCl Gradientenverlauf und die rot gestrichelte Linie steht für die Leitfähigkeitsänderung. Die gesammelten Fraktionen sind durch vertikale rote Linien mit entsprechender Nummerierung versehen.

Weitere Reinigung durch Chromatographie an einer Hydroxyapatitsäule (HA-Säule) erwies sich als sehr effektiv und zeigte ein bis zu ~ 98% reines HP0525-Protein durch Abtrennung von hauptsächlich niedermolekularen (unterhalb ~35 kDa) Verunreinigungen (Abbildung 23).

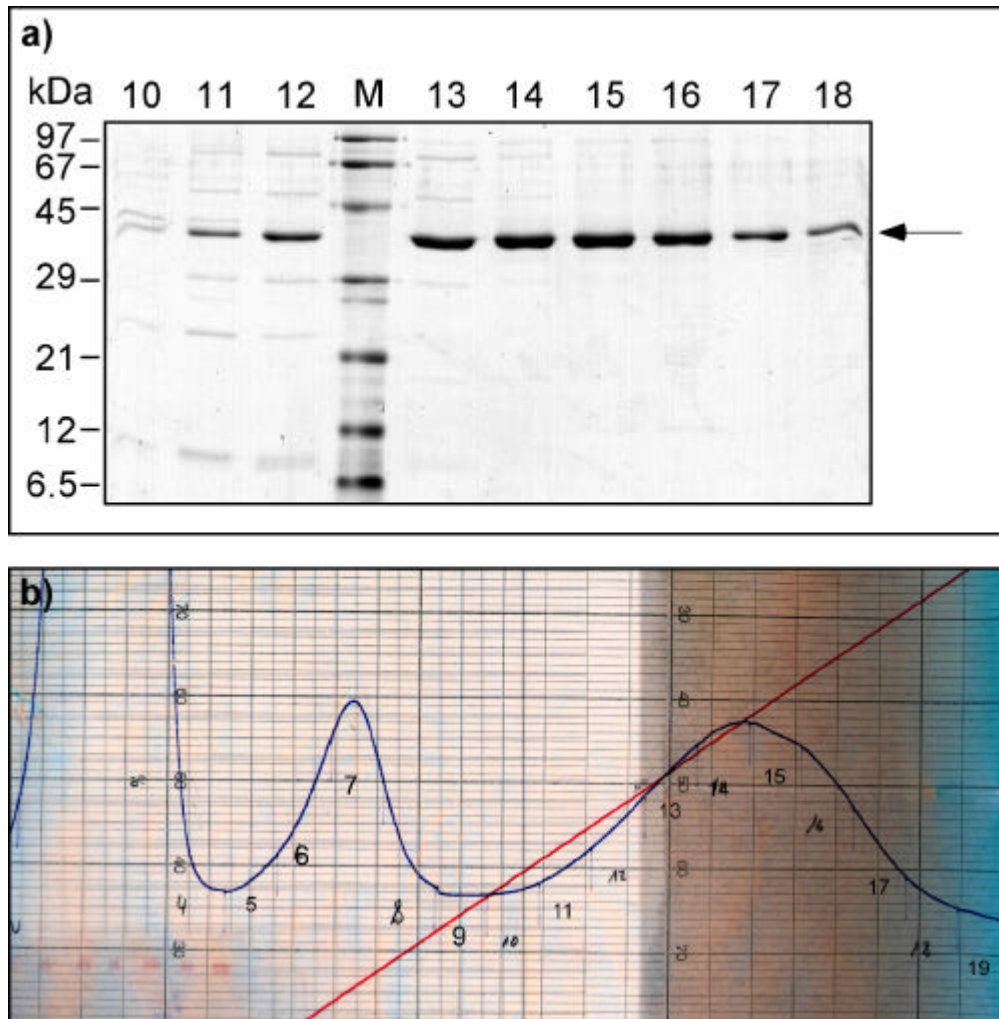


Abbildung 23: Reinigung des HP0525 durch Hydroxyapatitchromatographie. a) 15 %iges SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinfractionen (nummeriert entsprechend den Fractionen in b). Mit M ist die Spur mit Markerproteinen gekennzeichnet, deren Größen seitlich am Gel in kDa angegeben sind. b) Chromatogramm der Hydroxyapatitreinigung. In blau ist der Verlauf der Proteinelution mit den nummerierten Fractionen dargestellt. Der Kaliumphosphatgradient (20 mM bis 500 mM) ist abschnittsweise an der roten Linie erkennbar.

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Gelchromatographie (Superdex75 16/60 von Pharmacia) durchgeführt, die nur eine geringe Verbesserung der Reinheit in der SDS-PAGE zeigte (Abbildung 24). Die höhermolekularen Verunreinigungen (größer als 40 kDa) konnten nicht abgetrennt werden. Insgesamt zeigte HP0525 am Ende der Reinigung einen Reinigungsgrad, der üblicherweise zur Kristallisation eingesetzt wird.

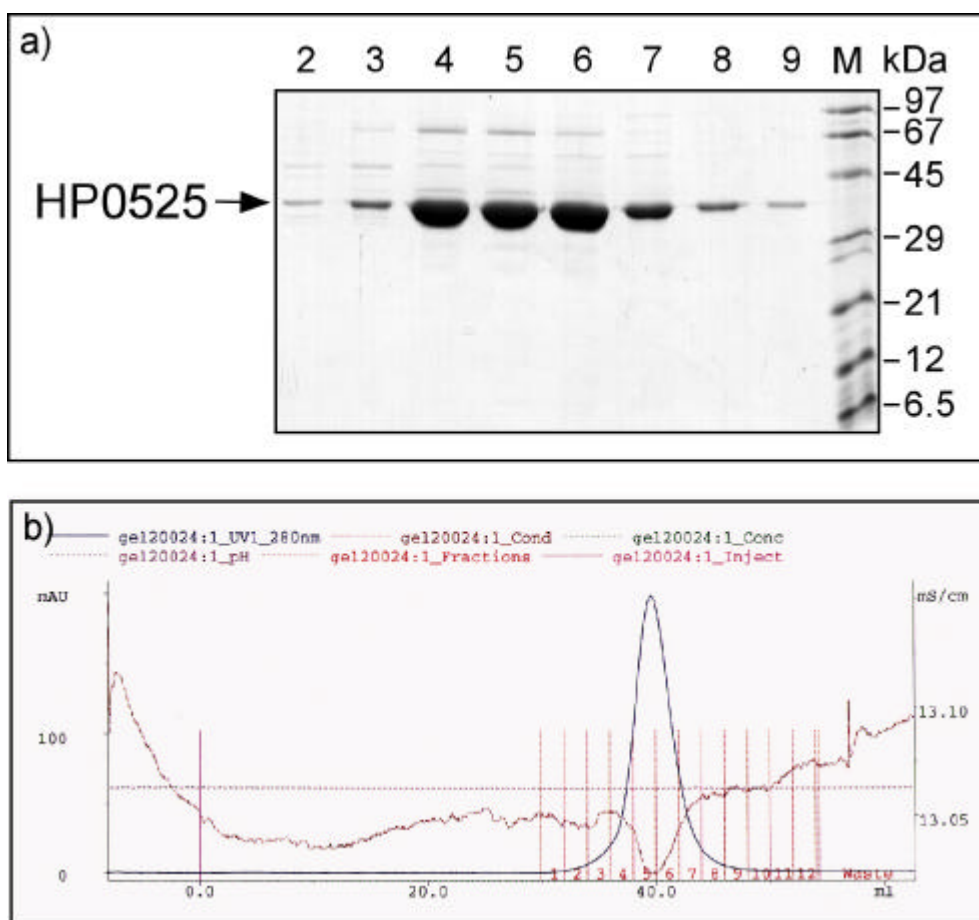


Abbildung 24: Reinigung des HP0525 durch Gelfiltration an einer Superdex 75 (16/60) Säule. a) 15% iges SDS-Gel mit aufgetragenen Peakfraktionen der Gelchromatographie. Die Spuren sind entsprechend den Fraktionen nummeriert. In Spur M sind die Markerproteine aufgetragen deren Größen an der Seite angegeben sind. b) Chromatogramm der Reinigung mit rot markierter vertikaler Fraktionseinteilung und in schwarz aufgezeichneten Elutionsverlauf.

Die Proteinfractionen 4 - 8 wurden vereinigt und auf eine Konzentration von 4,7 mg/ml eingengt. Aus 1 Liter Kultur konnten 6,8 mg mehr als 98% reines Protein gewonnen werden, welches zur Kristallisation eingesetzt wurde.

3.1.2 Selenomethionin-substituiertes HP0525

Selenomethionin-substituiertes Protein HP0525 (SeMet-HP0525) konnte ebenfalls in ausreichender Menge und zufrieden stellender Reinheit hergestellt werden (Abbildung 25, Spur 2 und 3). Beim ersten Reinigungsschritt durch 60 %ige Ammoniumsulfatfällung befand sich

SeMet-HP0525 im Überstand nach Abtrennung der gefällten Proteine (Pellet) durch Zentrifugation (Abbildung 25, Spur 6). Es konnte ein Teil der Fremdproteine als Verunreinigung abgetrennt werden. Der Überstand wurde bei 4 °C über Nacht gegen Puffer I dialysiert (10.000 Da Molekulargewichtsausschluss). Bei diesem Dialyseschritt kam es zu einer starken Ausfällung von Protein im Dialyseschlauch. Dieses gefällte Protein wurde von den löslichen Proteinen im Überstand durch Zentrifugation abgetrennt (Pellet) (Abbildung 25, Spur 7 und 8). Es wurde jeweils eine Probe vom Pellet und vom Überstand zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es stellte sich heraus, dass sich SeMet-HP0525 weiterhin in der löslichen Phase befand.

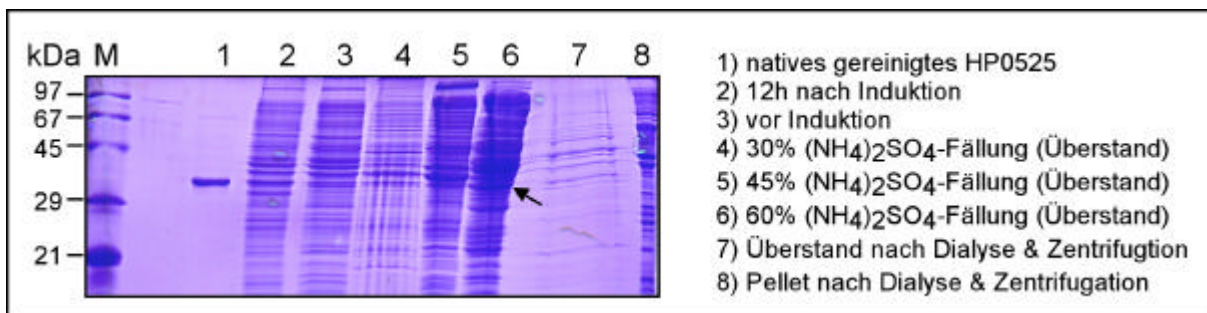


Abbildung 25: 15%iges SDS-Gel mit Proben der Proteinexpression und Ammoniumsulfatfällung. Die Spuren mit aufgetragenen Proben sind nummeriert und deren Inhalt an der rechten Seite des Gels erläutert. In der mit M markierten Spur sind Markerproteine mit verschiedenen Molekulargewichten aufgetragen, deren Größen an der linken Seite des Gels in kDa angegeben sind.

Durch die Reinigung an der Anionenaustauschsäule ResourceQ konnte nicht der Reinigungsgrad erzielt werden, wie er für das native Protein HP0525 zu sehen war. Das Protein enthielt näherungsweise 40% Fremdproteine als Verunreinigung nach Reinigung über ResourceQ. Abbildung 26 zeigt beispielhaft einen Ablauf des Reinigungsschrittes an der ResourceQ-Säule. Hier eluierte das Protein in nur einer Fraktion (Abbildung 26b, Spur16). Es wurden mehrere Reinigungsdurchläufe durchgeführt, um SeMet-HP0525 aus 8 Liter Kultur mit dieser Methode abzutrennen.

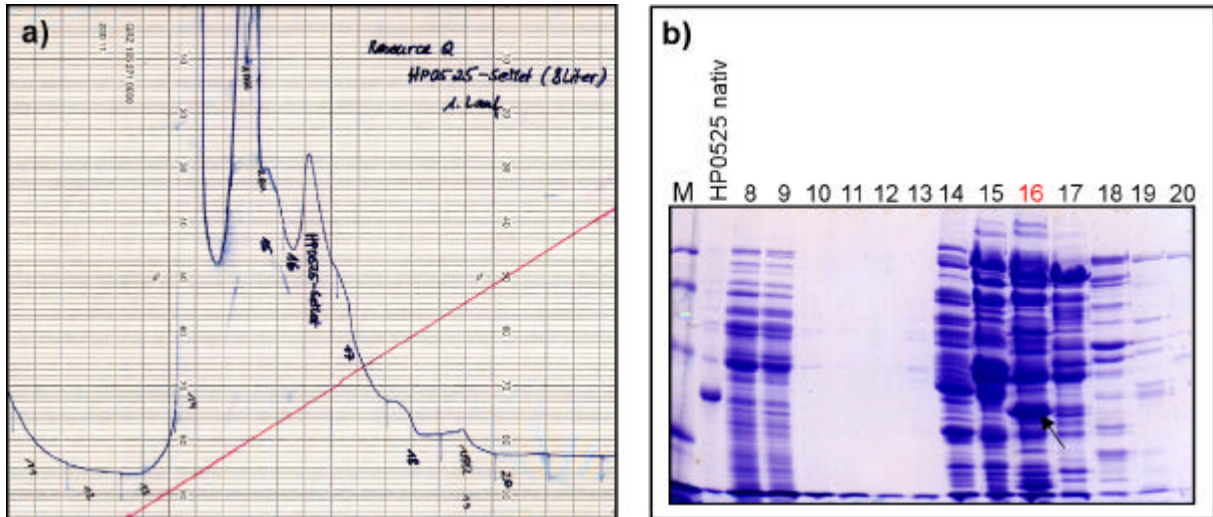


Abbildung 26: Reinigung des SeMet-HP0525 an ResourceQ. a) Chromatogramm der Reinigung mit ausschnittswiseem NaCl-Gradientenverlauf (rote Linie) von 20 mM bis 1M NaCl. Die Fraktionen wurden mit Handschrift beschriftet. b) 15 %iges SDS-Gel mit aufgetragenen Aliquots der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie. Die Fraktionen sind entsprechend der Elution beschriftet. Die rot beschriftete Fraktion enthält SeMet HP0525 (Pfeil). Die Spur M enthält Markerproteine mit folgenden Molekulargewichten (kDa) von oben nach unten – 97, 67, 45, 29. Zur Kontrolle wurde natives Protein HP0525 zur Wiedererkennung von HP0525 in den entsprechenden Fraktionen aufgetragen.

Die Reinigung über die Hydroxyapatitsäule zeigte hier einen sehr effizienten Reinigungserfolg (Abbildung 27), da viele niedermolekulare Verunreinigungen (unter 35 kDa) abgetrennt wurden (ähnlich dem nativen Protein HP0525). Für die Verarbeitung der von der ResourceQ-Säule kommenden SeMet-HP0525-Menge waren zwei Durchläufe notwendig.

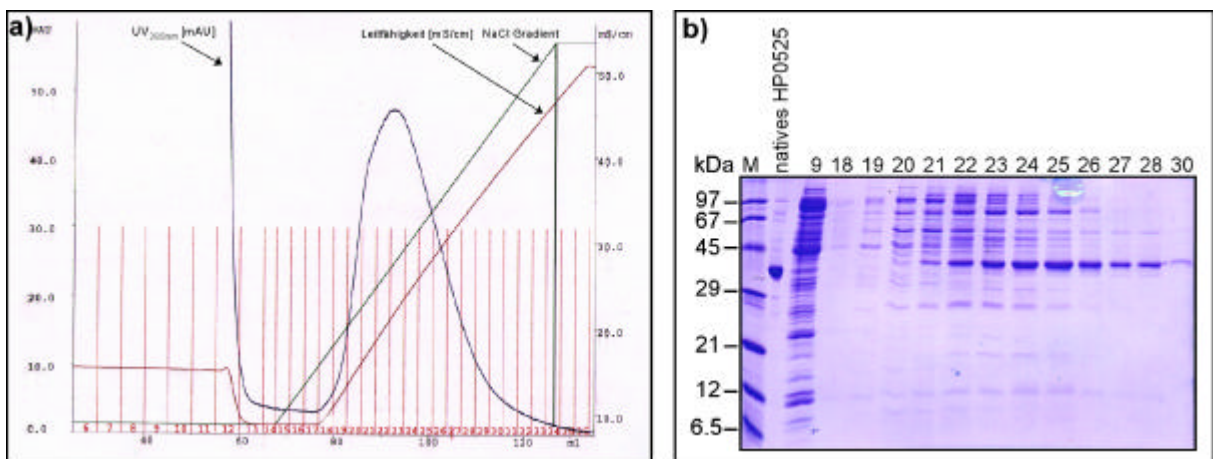


Abbildung 27: Reinigung des Proteins SeMet HP0525 über eine Hydroxyapatitsäule. a) Chromatogramm der Reinigung. Die Fraktionen sind durch vertikale rote Linien markiert und beschriftet. b) 15 %iges SDS-Gel mit Probenaufrag der entsprechend nummerierten Fraktionen der Reinigung. Für die Unterscheidung des SeMet-HP0525 von Fremdproteinen im Gel wurde in einer Spur ein Aliquot des gereinigten nativen Proteins aufgetragen.

Durch die Reinigung an der Gelsäule Superdex 75 wurde 80 – 85% reines Protein HP0525 erhalten (Abbildung 28).

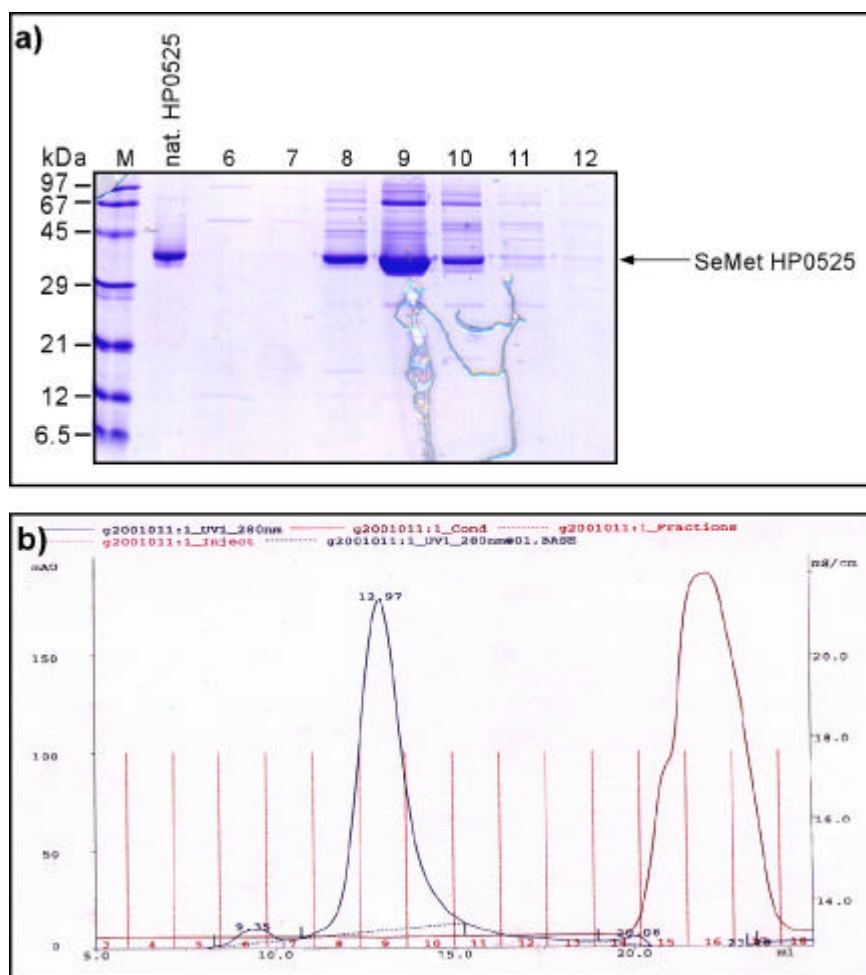


Abbildung 28: Letzter Reinigungsschritt von SeMet-HP0525 durch Gelchromatographie an Superdex 75. a) Auftrag der Proteinfractionen der Reinigung mit Nummerierung entsprechend der Fractionen im Chromatogramm. Als Referenz wurde ein Aliquot gereinigten nativen Proteins SeMet-HP0525 und Markerproteine (Spur M) aufgetragen mit den jeweiligen Größenangaben an der Seite des Gels in Kilodalton. Die blauen meist unregelmäßig verlaufenen vertikalen Linien sind Risse im SDS-Gel die durch Geltrocknung entstanden sind. b) Reinigungschromatogramm mit nummerierten gesammelten Fractionen (senkrechte rote Linien), Absorptionsspektrum (schwarz) bei UV 280 nm in Milli-Absorptionunits (AU) und Leitfähigkeitsspektrum (braun) in mS pro Zentimeter.

Die Ausbeute betrug 0,65 mg SeMet-HP0525 pro Liter Kultur. Das Protein wurde mit einer Konzentration von 7,9 mg/ml direkt zur Kristallisation verwendet.

3.2 Kristallisation

Bei der Kristallisation des nativen Proteins HP0525 mit verschiedenen Kristallisationslösungen in Screen I und II (Hampton) stellte sich heraus, dass es zehn Bedingungen gab, in denen Kristalle wuchsen. In sieben Bedingungen, die neben weiteren Komponenten jeweils Ammoniumsulfat in Konzentrationen von 1,6 - 2,0 M enthielten, konnten hexagonale Kristalle verschiedener Größe beobachtet werden (Screen I Lösungen 4, 32, 39, Screen II Lösungen 5, 14, 23, 32). Wie in Abbildung 29a zu sehen, waren die plättchenförmigen Kristalle in der ersten und zweiten Dimension ausreichend groß (150 – 250 μm), besaßen aber eine sehr geringe Dicke, die oftmals nicht größer als 25 μm war. Des Weiteren zeigte sich bei einigen Bedingungen, dass die Kristalle ineinander verwachsen waren. In dem Kristallisationsansatz des Screen I, Lösung 33, mit 4 M Natriumformiat konnten Nadeln beobachtet werden, und in der Screen-Bedingung II, Lösung 1, mit 10 % PEG 6000 und 2 M NaCl wuchsen kleine stäbchenartige Kristalle. Tetragonale Kristalle wurden in Screen II, Lösungsbedingung 37 (10 % PEG 8000, 8 % Ethylenglycol, 0,1 M Hepes pH 7,5), gesehen (Abbildung 29 c), welche an der hauseigenen Röntgenanlage anisotrop bis zu einer Auflösung von 10 – 12 Å streuten. Durch Variation sämtlicher Kristallisationsbedingungen, bei denen Kristalle beobachtet wurden, konnten bei einigen Bedingungen größere Kristalle erzeugt werden. Nach dem Testen der Kristalle auf Diffraktionsqualität an dem hauseigenen Rigaku-Röntgengenerator RU H2B mit $3 \times 0.3 \text{ mm}$ Fokus mit Kupfer-Drehanode und einem MAR345-Röntgendetektor (MARResearch, Norderstedt) mit MaxFlux-System stellte sich heraus, dass das Diffraktionsverhalten stark mit der Größe der dritten Kristalldimension korrelierte. Je größer das Kristallvolumen und je besser die Morphologie der Kristalle war, desto besser war die Auflösung des Diffraktionsmusters und umso klarer waren die Reflexe (kein Ausschmieren).

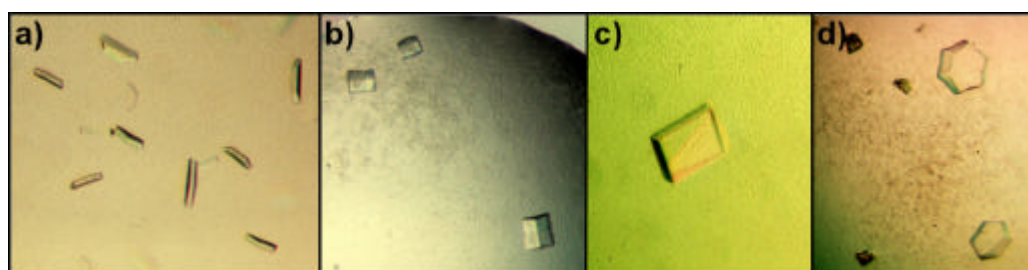


Abbildung 29: Native und SeMet-modifizierte Kristalle des Proteins HP0525. a) Sehr dünne hexagonale Kristalle aus Screen I Lösung 5. b) Kristalle aus der Variation der Hampton Screen I, Lösung 32. Von dem rechten unteren Kristall wurde der Datensatz an der BW7B bei EMBL/DESY aufgenommen. c) Tetragonale Kristallform resultierend aus Screen II, Lösungsbedingung 37. d) Hexagonaler Kristall des Selenomethionin-substituierten Proteins HP0525.

Aus der Variation der Bedingung 32 des Hampton Screen I konnte bei 2,1 M Ammoniumsulfat pH 7,0 ein Kristall mit den Abmessungen $150 \times 170 \times 50 \mu\text{m}$ erzeugt werden (Abbildung 29b unten rechts). Von diesem wurde ein Datensatz an der Messstation BW7B bei EMBL/DESY (Detektor: MAR 345 *image plate*) in Hamburg aufgenommen.

Zur Kristallisation des Selenomethionin substituierten Proteins HP0525 wurden ebenfalls die Kristallisationslösungen des Hampton Research Screens I und II verwendet. Für Bedingungen 32 und 39 aus Screen I zeigten sich hexagonale Kristalle. Diese waren entweder recht klein und verwachsen oder groß und sehr dünn. Durch Variation der Präzipitantkonzentration konnten größere und dickere Kristalle ($\sim 150 \times 150 \times 75 \mu\text{m}$) bei folgender Kristallisationsbedingung erhalten werden: 1,8 M Ammoniumsulfat, 2% PEG 400, 0,1 M Hepes pH 7,5 (Abbildung 29 d). Diese wurden an dem hauseigenen Rigaku-Generator getestet und streuten bis $3,2 \text{ \AA}$ in guter Qualität (scharfe Reflexe, geringe Mosaizität).

3.3 Datenauswertung

Die nativen HP0525-Kristalle wurden auf ihr Diffraktionsverhalten getestet und mit dem Programm DENZO indiziert. Ein Kristall zeigte bei den Testmessungen an dem hauseigenen Rigaku-Röntgengenerator besonders gute Diffraktionseigenschaften mit einer Auflösung bis $2,9 \text{ \AA}$ und war für eine Datensatzsammlung in Hamburg am EMBL/DESY an der BW7B-Messstation vorgesehen. Anhand der Diffraktionsmuster konnte ein primitiv rhomboedrisches Bravaisgitter (Raumgruppe R3) mit den Zellparametern von $a = 112,15 \text{ \AA}$, $c = 346,21 \text{ \AA}$ zugeordnet werden. Der Gittertyp, die Zellparameter der Einheitszelle des Kristalls und die Kristallorientierungsparameter wurden von einem einzigen Beugungsmuster abgeleitet. Für die primitiv rhomboedrische Raumgruppe konnte eine prozentuale Abweichung der beobachteten Zellparameter von dem entsprechenden vorhergesagten Gittertyp Verzerrungsindex von 0,27% ermittelt werden. Das beobachtete Diffraktionsmuster konnte gut mit dem vorhergesagten Gittertyp durch Verfeinerung der Kristall- und Detektorparameter in Einklang gebracht werden.

An der Messstation BW7B am EMBL/DESY in Hamburg wurde von diesem Kristall ein Datensatz mit einer Auflösung bis $2,2 \text{ \AA}$ aufgenommen, bei dem aus Zeitgründen (Ende der Messshift) nach 67 Diffraktionsbildern (Abbildung 30) die Messung abgebrochen wurde, woraus eine Vollständigkeit der Daten von 74% resultiert (Tabelle 9, Seite 85). Bei der

späteren Auswertung der Daten stellte sich heraus, dass dieser Kristall sich nicht mehr auf dem rhomboedrischen Bravaisgitter zuordnen ließ, sondern dass ein hexagonales Bravaisgitter mit 0,20% Abweichung der beobachteten zu vorhergesagten Gitterparametern indiziert wurde. Die Parameterabweichung für das rhomboedrische Bravaisgitter betrug nun 6,49 %. Der gesamte Datensatz ließ sich sehr gut auf die hexagonale Lauegruppe 6/mmm durch Verfeinerung der Kristall- und Detektorparameter anpassen. Aufgrund einer ungünstigen Orientierung des Kristalls zum Röntgenstrahl sind die systematisch ausgelöschten Reflexe auf der I – Achse nicht gemessen worden. So war die eindeutige Raumgruppenzuordnung in der Punktgruppe P622 nicht möglich, da keine Aussage über eine sechszählige Schraubenachse getroffen werden konnte.

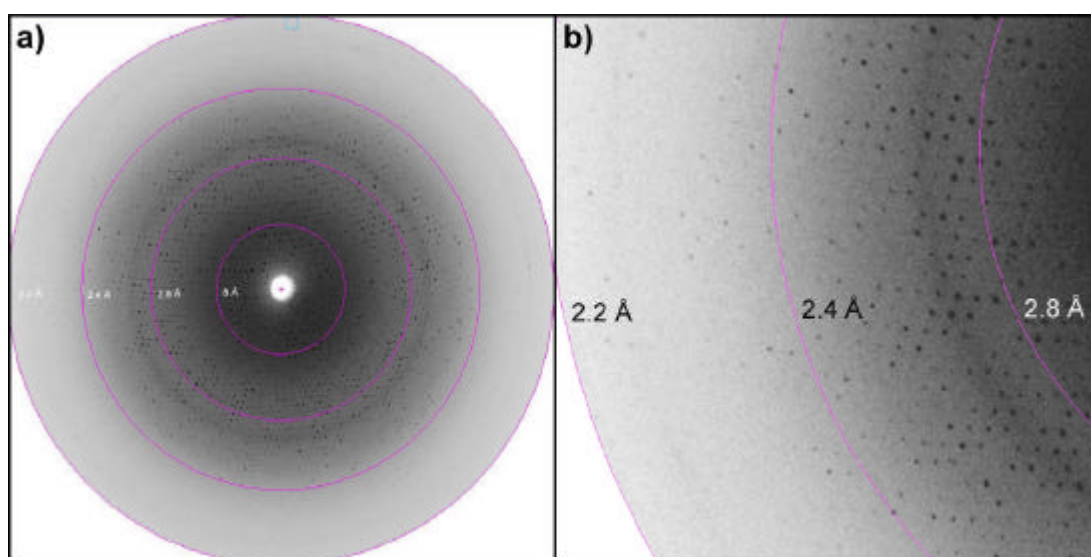


Abbildung 30: Diffractionsbilder des nativen Proteins HP0525. a) Exemplarisches Diffractionsmuster des nativen HP0525-Kristalls. b) Ausschnitt in den äußeren Auflösungsbereich des in a) abgebildeten Diffractionsbildes.

Die unterschiedliche Indizierung desselben Kristalls könnte aus der Anzahl der Peaks resultieren, die zur Indizierung herangezogen wurden. Die höhere Intensität der Röntgenstrahlung am Synchrotron im Vergleich zur Drehanode im eigenen Labor führte zu einer höheren Auflösung der Streudaten und zu höheren Reflexintensitäten. Beides erhöht die Anzahl der Reflexe und trägt somit zur Bestimmung der Lauegruppe bei.

In Tabelle 9 sind die Beugungsdaten für den nativen HP0525-Kristall zusammengefaßt.

Zu einer erneuten Datensammlung an nativen Kristallen und Selenomethionin-substituierten HP0525 Kristallen ist es aufgrund der Publikation der Kristallstruktur der hexameren ATPase HP0525 mit gebundenem ADP nicht mehr gekommen [123]. Da die Kristallstrukturanalyse die gesamte Struktur des HP0525 erklärte wurden weitere strukturelle Untersuchungen an diesem Protein als nicht mehr erforderlich angesehen und abgebrochen.

Tabelle 9: Datensammlungsstatistik des nativen HP0525-Kristalls

Datensatz	HP0525
	nativ
<i>Kristallographische Parameter</i>	
Wellenlänge [Å]	0,8428
Punktgruppe	622
Zellparameter [Å]	a = 112,13 c = 230,18
Datensammlungsstatistik ^a	
Auflösung [Å]	40,0 – 2,20 (2,25 -2,20)
Vollständigkeit [%]	73,7 (69,4)
durchschnittliche I/σ?	9,1
R _{merge} [%] ^b	11,0 (46,8)
Anzahl der unabhängigen Reflexe	32712 (2014)
^a Die Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale. ^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i - \langle I \rangle }{\sum \langle I \rangle}$ mit I_i der Intensität des beobachteten hkl Reflexes und $\langle I \rangle$ der durchschnittlichen Intensität dieses Reflexes	

3.4 Strukturdarstellung der ATPase HP0525

Ich möchte trotz alledem einen Einblick in die von Yeo H.J. et al [123] publizierte Kristallstruktur von *Helicobacter pylori* HP0525 mit einer Auflösung von 2,5 Å geben. Sie fanden, dass 6 Monomere über eine 6-zählige Achse zu einem Hexamer zusammengelagert sind.

3.4.1 Die monomere Struktur von HP0525

Die monomere ADP-HP0525 Komplexstruktur [123] besteht aus zwei aneinander grenzenden Domänen, die durch einen kurzen Linker verbunden sind (Abbildung 31). Jede Domäne besteht aus einem ausgedehnten zentralen β - Faltblatt mit seitlich angelagerten α - Helices. Die eine Seite des N-terminalen β - Faltblatts bildet eine polare Oberfläche aus, die hauptsächlich als Kontaktfläche zu anderen Untereinheiten in dem Hexamer genutzt wird.

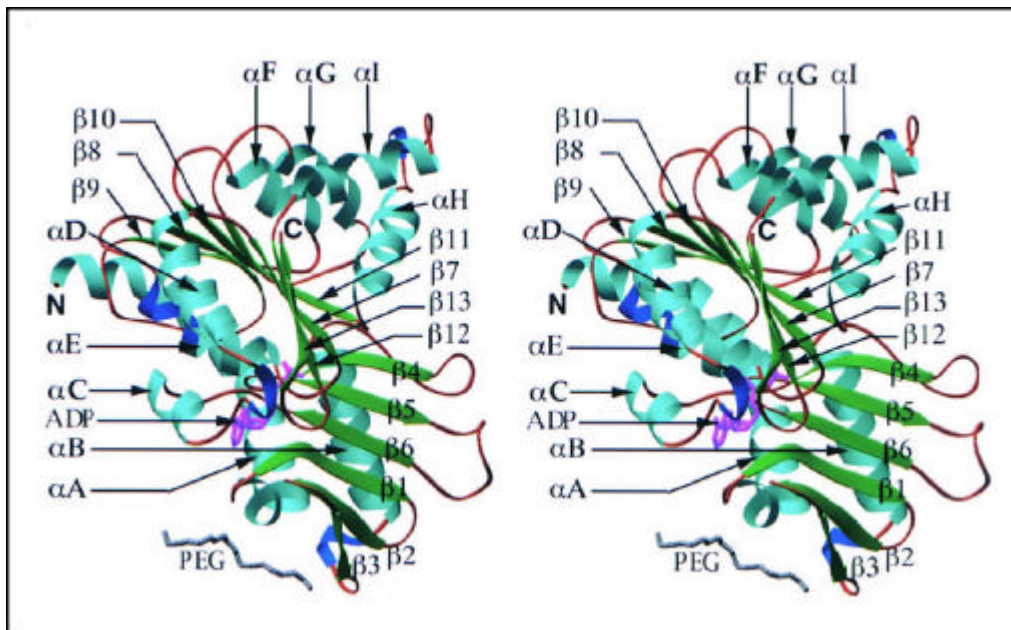


Abbildung 31: Stereoabbildung des monomeren HP0525 mit gebundenem ADP und einem PEG-Fragment. α - Helices sind in blau und β - Stränge in grüner Farbe dargestellt. Das gebundene ADP ist in magenta und das PEG-Molekül ist in grau abgebildet. Die Sekundärstrukturelemente sind beschriftet mit $\beta 2$ bis $\beta 13$ für die Faltblattstränge und αA bis αI für die Helices. N und C bezeichnen die N- und C-Termini des Proteins. Diese Abbildung wurde der Publikation von Yeo H. J. et al. [123] entnommen.

3.4.2 Das hexamere Protein HP0525

Nun noch einen kleinen Einblick in die hexamere ATPase HP0525. Die zusammengelagerten Untereinheiten sind in verschlungener, Propeller-ähnlicher Form zusammengesetzt, wobei Reste beider Domänen individueller Untereinheiten in der Grenzfläche zwischen Untereinheiten involviert sind. Die allgemeine Form des ADP-Hexamers wird von Yeo et al. [123] als eine Klammer mit sechs Krallen, angeordnet zu einem hexameren Ring beschrieben (Abbildung 32).

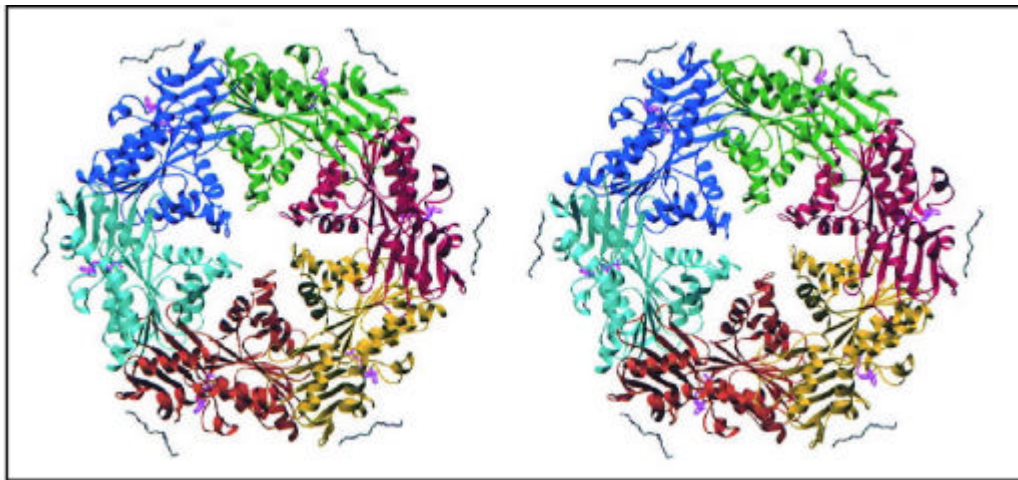


Abbildung 32: Stereodarstellung des hexameren HP0525 mit Blick in die große Vertiefung, welche durch die N – terminale Domäne ausgebildet wird. Jede Domäne ist mit unterschiedlicher Farbe dargestellt. Das gebundene ADP ist in magenta und das PEG ist in grau zu sehen. Diese Abbildung ist der Publikation von Yeo H. J. et al. entnommen [123].

Die N - und C - terminalen Domänen des hexameren Rings formen zwei separate Ringstrukturen. Der N – terminale Ring ist innerhalb zylindrisch ausgebildet und der C – terminale Ring im Gegensatz dazu innerhalb konisch zugeschnitten. Jede C – terminale Domäne des Rings erscheint als eine Art krallenartige Klammer. Durch diesen Vergleich wird die vermutliche Funktion des HP0525 als Proteintransporter abgeleitet. Es wird vermutet, dass der hauptsächlich hydrophobe N – terminale Ring in eine Membran eingebettet ist, da eine Assoziation an die Membran bei VirB11-ATPasen bekannt ist. In geschlossener Krallenkonformation würde die streng negativ geladene Spitze der C – terminalen Domäne dem Cytoplasma gegenüberstehen, das HP0525-Hexamer verschließen und entweder als abstoßende oder anziehende Kraft für einen bis jetzt unbekannten Bindungspartner oder Substrate wirken.

Später (2003) wurde auch die Apo-Struktur von HP0525 (ohne gebundenes ADP) von Savvides S. N. et al. [124] publiziert. Diese zeigt ebenfalls einen asymmetrisch hexameren

Aufbau der jedoch entgegen unseren Erwartungen signifikante Unterschiede zu der ADP-HP0525-Komplexstruktur zeigt.

IV. LITERATURANGABE

- [1] Riek, R.; Pervushin, K. und Wuthrich, K. (2000): TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution, Trends Biochem Sci 25 [10], Seite 462-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11050425
- [2] Bragg, W. L. (1913): The diffraction of short elektromagnetic waves by a crystal., Proc. Cambr. Philos. Soc. 17, Seite 43-57.
- [3] Bragg, W. L. (1913): The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays., Proc. R. Soc. London A90, Seite 248-277.
- [4] Henrissat, B. (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem J 280 (Pt 2), Seite 309-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1747104
- [5] Henrissat, B. und Bairoch, A. (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochem J 293 (Pt 3), Seite 781-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8352747

-
- [6] Henrissat, B. und Bairoch, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem J* 316 (Pt 2), Seite 695-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8687420
- [7] Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Jr. und Warren, R. A. (1991): Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families, *Microbiol Rev* 55 [2], Seite 303-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1886523
- [8] Tomme, P.; Warren, R. A.; Miller, R. C., Jr.; Kilburn, D. G. und Gilkes, N. R. (1995): Cellulose-binding domains: classification and properties., Penner, M.H., eds., *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates* Seite 142-163, American Chemical Society, Washington.
- [9] Bolam, D. N.; Xie, H.; White, P.; Simpson, P. J.; Hancock, S. M.; Williamson, M. P. und Gilbert, H. J. (2001): Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A, *Biochemistry* 40 [8], Seite 2468-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11327868
- [10] Boraston, A. B.; McLean, B. W.; Chen, G.; Li, A.; Warren, R. A. und Kilburn, D. G. (2002): Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase, *Mol Microbiol* 43 [1], Seite 187-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11849546

- [11] Boraston, A. B.; McLean, B. W.; Kormos, J. M.; Alam, M. M.; Gilkes, N. R.; Haynes, C. A.; Tomme, P.; Kilburn, D. G. und Warren, R. A. (1999): Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function., eds., Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [12] Boraston, A. B.; Nurizzo, D.; Notenboom, V.; Ducros, V.; Rose, D. R.; Kilburn, D. G. und Davies, G. J. (2002): Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related beta-1,4 and beta-1,3 glucan-binding modules, J Mol Biol 319 [5], Seite 1143-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12079353
- [13] Notenboom, V.; Boraston, A. B.; Chiu, P.; Freelove, A. C.; Kilburn, D. G. und Rose, D. R. (2001): Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study, J Mol Biol 314 [4], Seite 797-806. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11733998
- [14] Szabo, L.; Jamal, S.; Xie, H.; Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J. und Davies, G. J. (2001): Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose. Evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation, J Biol Chem 276 [52], Seite 49061-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11598143
- [15] Czjzek, M.; Bolam, D. N.; Mosbah, A.; Allouch, J.; Fontes, C. M.; Ferreira, L. M.; Bornet, O.; Zamboni, V.; Darbon, H.; Smith, N. L.; Black, G. W.; Henrissat, B. und Gilbert, H. J. (2001): The location of the ligand-binding site of carbohydrate-binding

- modules that have evolved from a common sequence is not conserved, J Biol Chem 276 [51], Seite 48580-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11673472
- [16] Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Turkenburg, J. P.; Gilbert, H. J.; Ferreira, L. M.; Davies, G. J. und Fontes, C. M. (2000): The X6 "thermostabilizing" domains of xy-lanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the Clostridium thermocellum X6b domain, Biochemistry 39 [17], Seite 5013-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10819965
- [17] Brun, E.; Johnson, P. E.; Creagh, A. L.; Tomme, P.; Webster, P.; Haynes, C. A. und McIntosh, L. P. (2000): Structure and binding specificity of the second N-terminal cellulose-binding domain from Cellulomonas fimi endoglucanase C, Biochemistry 39 [10], Seite 2445-58. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10704194
- [18] Charnock, S. J.; Bolam, D. N.; Nurizzo, D.; Szabo, L.; McKie, V. A.; Gilbert, H. J. und Davies, G. J. (2002): Promiscuity in ligand-binding: The three-dimensional structure of a Piromyces carbohydrate-binding module, CBM29-2, in complex with cello- and mannohexaose, Proc Natl Acad Sci U S A 99 [22], Seite 14077-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12391332
- [19] Johnson, P. E.; Joshi, M. D.; Tomme, P.; Kilburn, D. G. und McIntosh, L. P. (1996): Structure of the N-terminal cellulose-binding domain of Cellulomonas fimi CenC determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, Biochemistry 35 [45], Seite

14381-94. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8916925

- [20] Simpson, P. J.; Bolam, D. N.; Cooper, A.; Ciruela, A.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. und Williamson, M. P. (1999): A family IIb xylan-binding domain has a similar secondary structure to a homologous family IIa cellulose-binding domain but different ligand specificity, *Structure Fold Des* 7 [7], Seite 853-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10425686
- [21] Simpson, P. J.; Xie, H.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J. und Williamson, M. P. (2000): The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules, *J Biol Chem* 275 [52], Seite 41137-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10973978
- [22] McLean, B. W.; Bray, M. R.; Boraston, A. B.; Gilkes, N. R.; Haynes, C. A. und Kilburn, D. G. (2000): Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues, *Protein Eng* 13 [11], Seite 801-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11161112
- [23] Ponyi, T.; Szabo, L.; Nagy, T.; Orosz, L.; Simpson, P. J.; Williamson, M. P. und Gilbert, H. J. (2000): Trp22, Trp24, and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from *Pseudomonas* xylanase A to insoluble ligands, *Biochemistry* 39 [5], Seite 985-91. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10653642

- [24] Xie, H.; Bolam, D. N.; Nagy, T.; Szabo, L.; Cooper, A.; Simpson, P. J.; Lakey, J. H.; Williamson, M. P. und Gilbert, H. J. (2001): Role of hydrogen bonding in the interaction between a xylan binding module and xylan, *Biochemistry* 40 [19], Seite 5700-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11341835
- [25] Sunna, A.; Gibbs, M. D. und Bergquist, P. L. (2001): Identification of novel beta-mannan- and beta-glucan-binding modules: evidence for a superfamily of carbohydrate-binding modules, *Biochem J* 356 [Pt 3], Seite 791-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11389686
- [26] Frelove, A. C.; Bolam, D. N.; White, P.; Hazlewood, G. P. und Gilbert, H. J. (2001): A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*, *J Biol Chem* 276 [46], Seite 43010-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11560933
- [27] Stoll, D.; Boraston, A.; Stalbrand, H.; McLean, B. W.; Kilburn, D. G.; Warren, R. A. J. (2000): Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a mannan-binding module, *FEMS Microbiol Ecology* [183], Seite 265-269.
- [28] Davies, G. und Henrissat, B. (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure* 3 [9], Seite 853-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8535779

- [29] McCarter, J. D. und Withers, S. G. (1994): Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Curr Opin Struct Biol* 4 [6], Seite 885-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7712292
- [30] Sinnott, M. L. (1991): Catalytic mechanism of enzymic glycoside transfer., *Chem.Rev.* 90, Seite 1170-1202.
- [31] Reese, E. T. und Shibata, Y. (1965): Beta-Mannanases of Fungi, *Can J Microbiol* 11, Seite 167-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14323029
- [32] Luonteri, E.; Tenkanen, M. und Viikari, L. (1998): Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum* alpha-galactosidases, *Enzyme Microb Technol* 22 [3], Seite 192-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9463945
- [33] Brett, C. T. und Waldre, K. (1996): Physiology and biochemistry of plant cell walls 1, Chapman and Hall, London.
- [34] Dekker, R. F. und Richards, G. N. (1976): Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action, *Adv Carbohydr Chem Biochem* 32, Seite 277-352. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=782186
- [35] Matheson, N. K. und McCleary, B. V. (1985): "The polysaccharides" 3, Aspinall, G.O., Academic Press, New York.

- [36] McCleary, B. V. und Matheson, N. K. (1986): Enzymic analysis of polysaccharide structure, *Adv Carbohydr Chem Biochem* 44, Seite 147-276. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3101407
- [37] McCleary, B. V. (1979): Enzymatic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans., *Carbohydr. Res.* 71, Seite 205-230.
- [38] Boraston, A. B.; Revett, T. J.; Boraston, C. M.; Nurizzo, D. und Davies, G. J. (2003): Structural and Thermodynamic Dissection of Specific Mannan Recognition by a Carbohydrate Binding Module, TmCBM27, *Structure (Camb)* 11 [6], Seite 665-75. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12791255
- [39] Civas, A.; Eberhard, R.; Le Dizet, P. und Petek, F. (1984): Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted alpha-D-galactosidase and beta-D-mannanase, *Biochem J* 219 [3], Seite 857-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6331399
- [40] Stalbrand, H.; Siika-Aho, M.; Tenkanen, M. und Viikari, L. (1993): Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*., *J. Biotechnol.* 29, Seite 229-242.
- [41] Avigad, G. und Dey, P. M. (1997): Carbohydrate metabolism: storage carbohydrate., Harborne, J. B., *Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego, London.
- [42] Dekker, R. F. (1985): Biodegradation of the hemicelluloses., Higuchi, T., *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Academic Press, Inc., Orlando.

-
- [43] Araujo, G. O. und Ward, O. P. (1990): Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi., J. Ind. Microbiol. 6, Seite 171-178.
- [44] McCleary, B. V. (1988): β -D-Mannanase., Methods in Enzymology 160, Seite 171-178.
- [45] Jones, J. K. N. (1950): The structure of the mannan present in *Porphyra umbilicalis*., J. Chem. Soc., Seite 3292-3295.
- [46] Love, J. O. und Percival, E. (1964): The polysaccharides of green seaweed *Codium fragile*., J. Chem. Soc., Seite 3345-3350.
- [47] Aspinall, G.O.; Hirst, E. L.; Percival, E. und Williamson, I. R. (1953): The mannans of ivory nut (*Phytelephas macrocarpa*) part I. The methylation of mannan A and mannan B., J. Chem. Soc., Seite 3184-3188.
- [48] Wolfrom, M.; Laver, M. L. und Patin, D. L. (1961): Carbohydrate of the coffee beans II. Isolation and characterization of a mannan., J. Org. Chem. 26, Seite 4533-4535.
- [49] Kantelinen, A.; Hortling, B.; Sundquist, J.; Linko, M. und Viikari, L. (1993): Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases., Holzforschung 47, Seite 381-324.
- [50] Viikari, L.; Sundquist, J. und Kettunen, J. (1991): Xylanase enzymes promote pulp bleaching., Paper Timber 73, Seite 384-389.
- [51] Viikari, L.; Kantelinen, A.; Buchert, J. und Puls, J. (1994): Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials., Appl Microbiol Biotechnol 41, Seite 124-129.
- [52] Buchert, J.; Salminen, J.; Siika-Aho, M.; Ranua, M. und Viikari, L. (1993): The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching., Holzforschung 47, Seite 473-478.

- [53] Gibbs, M. D.; Elinder, A. U.; Reeves, R. A. und Bergquist, P. L. (1996): Sequencing, cloning and expression of a beta-1,4-mannanase gene, *manA*, from the extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4, FEMS Microbiol Lett 141 [1], Seite 37-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8764509
- [54] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 [259], Seite 680-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063
- [55] Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, Anal Biochem 182 [2], Seite 319-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2610349
- [56] Budisa, N.; Steipe, B.; Demange, P.; Eckerskorn, C.; Kellermann, J. und Huber, R. (1995): High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*, Eur J Biochem 230 [2], Seite 788-96. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7607253
- [57] Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining, Electrophoresis 6, Seite 103-112.
- [58] Baxa, U.; Cooper, A.; Weintraub, A.; Pfeil, W. und Seckler, R. (2001): Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike pro-

- tein, Biochemistry 40 [17], Seite 5144-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11318636
- [59] Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991), J Appl Cryst 24, Seite 409-411.
- [60] Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997): Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, Methods in Enzymology 276, Seite 307-326.
- [61] Kabsch, W. (1988): Evaluation of single crystal X-ray diffraction data from a position sensitive detector., J Appl Cryst 21, Seite 916-924.
- [62] Dauter, Z.; Dauter, M. und Dodson, E. (2002): Jolly SAD, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58 [Pt 3], Seite 494-506. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11856836
- [63] Terwilliger, T. C. und Berendzen, J. (1999): Automated MAD and MIR structure solution, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 55 (Pt 4), Seite 849-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10089316
- [64] Terwilliger, T. C. (2001): Maximum-likelihood density modification using pattern recognition of structural motifs, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57 [Pt 12], Seite 1755-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11717487
- [65] Jones, T. A.; Zou, J. Y.; Cowan, S. W. und Kjeldgaard (1991): Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, Acta Crystallogr A 47 (Pt 2), Seite 110-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2025413

- [66] Brünger, A. T. (1992): Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures., *Nature* 355, Seite 472-475.
- [67] Engh, R. A. und Huber, R. (1991): Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement., *Acta Crystallogr A* 47, Seite 392-400.
- [68] Murshudov, G. N.; Vagin, A. A. und Dodson, E. J. (1997.): Refinement of macromolecular structures by the maximum likelihood method, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, Seite 240-255.
- [69] CCP4 (1994): The CCP4 suite: programs for protein crystallography., *Acta Crystallogr*, Seite 760-763.
- [70] Perrakis, A.; Morris, R. und Lamzin, V. S. (1999): Automated protein model building combined with iterative structure refinement, *Nat Struct Biol* 6 [5], Seite 458-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10331874
- [71] Navaza, J. (2001): Implementation of molecular replacement in AMoRe, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57 [Pt 10], Seite 1367-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11567147
- [72] Boraston, A. B.; Ghaffari, M.; Warren, R. A. und Kilburn, D. G. (2002): Identification and glucan-binding properties of a new carbohydrate-binding module family, *Biochem J* 361 [Pt 1], Seite 35-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11743880

- [73] Pell, G.; Williamson, M. P.; Walters, C.; Du, H.; Gilbert, H. J. und Bolam, D. N. (2003): Importance of hydrophobic and polar residues in ligand binding in the family 15 carbohydrate-binding module from *Cellvibrio japonicus* Xyn10C, *Biochemistry* 42 [31], Seite 9316-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12899618
- [74] Tomme, P.; Creagh, A. L.; Kilburn, D. G. und Haynes, C. A. (1996): Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis, *Biochemistry* 35 [44], Seite 13885-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8909285
- [75] Boraston, A. B.; Warren, R. A. und Kilburn, D. G. (2001): beta-1,3-Glucan binding by a thermostable carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima*, *Biochemistry* 40 [48], Seite 14679-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11724582
- [76] Creagh, A. L.; Ong, E.; Jervis, E.; Kilburn, D. G. und Haynes, C. A. (1996): Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [22], Seite 12229-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8901562
- [77] Matthews, B. W. (1968): Solvent content of protein crystals, *J Mol Biol* 33 [2], Seite 491-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5700707

- [78] Stout G., Jensen L. (1968): X-ray structure determination. A practical guide., Macmillan Company, New York.
- [79] Xie, H.; Gilbert, H. J.; Charnock, S. J.; Davies, G. J.; Williamson, M. P.; Simpson, P. J.; Raghothama, S.; Fontes, C. M.; Dias, F. M.; Ferreira, L. M. und Bolam, D. N. (2001): Clostridium thermocellum Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding, Biochemistry 40 [31], Seite 9167-76.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11478884
- [80] Notenboom, V.; Boraston, A. B.; Kilburn, D. G. und Rose, D. R. (2001): Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from Thermotoga maritima xy-lanase 10A in native and ligand-bound forms, Biochemistry 40 [21], Seite 6248-56.
URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11371186
- [81] Weis, W. I. und Drickamer, K. (1996): Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, Annu Rev Biochem 65, Seite 441-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811186
- [82] Heinemann U., et al. (1996): Enzymology and folding of natural and engineered bacterial β -glucanases studies by X-ray crystallography., Biol.Chem. 377, Seite 447-454.

- [83] Holm, L. und Sander, C. (1993): Protein structure comparison by alignment of distance matrices, J Mol Biol 233 [1], Seite 123-38. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8377180
- [84] Spurway, T. D.; Morland, C.; Cooper, A.; Sumner, I.; Hazlewood, G. P.; O'Donnell, A. G.; Pickersgill, R. W. und Gilbert, H. J. (1997): Calcium protects a mesophilic xylanase from proteinase inactivation and thermal unfolding, J Biol Chem 272 [28], Seite 17523-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9211898
- [85] Boraston, A. B.; Creagh, A. L.; Alam, M. M.; Kormos, J. M.; Tomme, P.; Haynes, C. A.; Warren, R. A. und Kilburn, D. G. (2001): Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A, Biochemistry 40 [21], Seite 6240-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11371185
- [86] Huang, K. und Miller, W. (1991), Adv.Appl.Math. 12, Seite 373-381.
- [87] Lederberg, J. und Tatum, E.T. (1946): Gene Recombination in *Escherichia coli*, Nature 158, Seite 558.
- [88] Cavalli, L. L.; Lederberg, J. und Lederberg, E. M. (1953): An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*, J Gen Microbiol 8 [1], Seite 89-103. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13035035

- [89] Hayes, W. (1953): Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*, *J Gen Microbiol* 8 [1], Seite 72-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13035034
- [90] Datta, N. (1985): Plasmids as organisms, *Basic Life Sci* 30, Seite 3-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3893411
- [91] Datta, N.; Hedges, R. W.; Shaw, E. J.; Sykes, R. B. und Richmond, M. H. (1971): Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 108 [3], Seite 1244-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4945193
- [92] Watanabe, T. (1963): Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria, *Bacteriol Rev* 27, Seite 87-115. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13999115
- [93] Franke, A. E. und Clewell, D. B. (1981): Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid, *J Bacteriol* 145 [1], Seite 494-502. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6257641
- [94] She, Q.; Phan, H.; Garrett, R. A.; Albers, S. V.; Stedman, K. M. und Zillig, W. (1998): Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon, *Extremophiles* 2 [4], Seite 417-25. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9827331

- [95] Pansegrau, W.; Balzer, D.; Kruft, V.; Lurz, R. und Lanka, E. (1990): In vitro assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4, Proc Natl Acad Sci U S A 87 [17], Seite 6555-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2168553
- [96] Howard, M. T.; Nelson, W. C. und Matson, S. W. (1995): Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer, J Biol Chem 270 [47], Seite 28381-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7499340
- [97] Scheiffele, P.; Pansegrau, W. und Lanka, E. (1995): Initiation of Agrobacterium tumefaciens T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro, J Biol Chem 270 [3], Seite 1269-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7836390
- [98] Tinland, B.; Schoumacher, F.; Gloeckler, V.; Bravo-Angel, A. M. und Hohn, B. (1995): The Agrobacterium tumefaciens virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome, Embo J 14 [14], Seite 3585-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7628458
- [99] Llosa, M.; Bolland, S. und de la Cruz, F. (1994): Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388, J Mol Biol 235 [2], Seite 448-64.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8289274

- [100] Das, A. und Xie, Y. H. (1998): Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins, *Mol Microbiol* 27 [2], Seite 405-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9484895
- [101] Lee, M. H.; Kosuk, N.; Bailey, J.; Traxler, B. und Manoil, C. (1999): Analysis of F factor TraD membrane topology by use of gene fusions and trypsin-sensitive insertions, *J Bacteriol* 181 [19], Seite 6108-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10498725
- [102] Grahn, A. M.; Haase, J.; Bamford, D. H. und Lanka, E. (2000): Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems, *J Bacteriol* 182 [6], Seite 1564-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10692361
- [103] Moncalian, G.; Cabezon, E.; Alkorta, I.; Valle, M.; Moro, F.; Valpuesta, J. M.; Goni, F. M. und de La Cruz, F. (1999): Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation, *J Biol Chem* 274 [51], Seite 36117-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10593894

- [104] Thanassi, D. G. und Hultgren, S. J. (2000): Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane, *Curr Opin Cell Biol* 12 [4], Seite 420-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10873830
- [105] Christie, P. J. (2001): Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines, *Mol Microbiol* 40 [2], Seite 294-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11309113
- [106] Odenbreit, S.; Puls, J.; Sedlmaier, B.; Gerland, E.; Fischer, W. und Haas, R. (2000): Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion, *Science* 287 [5457], Seite 1497-500. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10688800
- [107] Llosa, M.; Gomis-Ruth, F. X.; Coll, M. und de la Cruz Fd, F. (2002): Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport, *Mol Microbiol* 45 [1], Seite 1-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12100543
- [108] Motallebi-Veshareh, M.; Balzer, D.; Lanka, E.; Jagura-Burdzy, G. und Thomas, C. M. (1992): Conjugative transfer functions of broad-host-range plasmid RK2 are coregulated with vegetative replication, *Mol Microbiol* 6 [7], Seite 907-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1376390

- [109] Christie, P. J. und Vogel, J. P. (2000): Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells, Trends Microbiol 8 [8], Seite 354-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10920394
- [110] Dang, T. A.; Zhou, X. R.; Graf, B. und Christie, P. J. (1999): Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter, Mol Microbiol 32 [6], Seite 1239-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10383764
- [111] Haase, J.; Lurz, R.; Grahn, A. M.; Bamford, D. H. und Lanka, E. (1995): Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex, J Bacteriol 177 [16], Seite 4779-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7642506
- [112] Krause, S.; Pansegrau, W.; Lurz, R.; de la Cruz, F. und Lanka, E. (2000): Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases, J Bacteriol 182 [10], Seite 2761-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10781544

- [113] Krause, S.; Barcena, M.; Pansegrau, W.; Lurz, R.; Carazo, J. M. und Lanka, E. (2000): Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [7], Seite 3067-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10716714
- [114] Thorstenson, Y. R.; Kuldau, G. A. und Zambryski, P. C. (1993): Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure, *J Bacteriol* 175 [16], Seite 5233-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8349563
- [115] Rashkova, S.; Spudich, G. M. und Christie, P. J. (1997): Characterization of membrane and protein interaction determinants of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase, *J Bacteriol* 179 [3], Seite 583-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9006008
- [116] Covacci, A.; Telford, J. L.; Del Giudice, G.; Parsonnet, J. und Rappuoli, R. (1999): *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography, *Science* 284 [5418], Seite 1328-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10334982
- [117] Wotherspoon, A. C. (1998): Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*, *Annu Rev Med* 49, Seite 289-99. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9509264

- [118] Graham, D. Y. (2000): *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer, J Gastroenterol 35 Suppl 12, Seite 90-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779226
- [119] Segal, E. D.; Cha, J.; Lo, J.; Falkow, S. und Tompkins, L. S. (1999): Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [25], Seite 14559-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10588744
- [120] Asahi, M.; Azuma, T.; Ito, S.; Ito, Y.; Suto, H.; Nagai, Y.; Tsubokawa, M.; Tohyama, Y.; Maeda, S.; Omata, M.; Suzuki, T. und Sasakawa, C. (2000): *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells, J Exp Med 191 [4], Seite 593-602. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10684851
- [121] Stein, M.; Rappuoli, R. und Covacci, A. (2000): Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation, Proc Natl Acad Sci U S A 97 [3], Seite 1263-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655519
- [122] Cooper, T. G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

- [123] Yeo, H.J.; Savvides, N. S.; Herr, A. B.; Lanka, E. und Waksman, G. (2000): Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the helicobacter pylori Type IV secretion system, *Molecular Cell* 6, Seite 1461-1472.
- [124] Savvides, S. N.; Yeo, H. J.; Beck, M. R.; Blaesing, F.; Lurz, R.; Lanka, E.; Buhrdorf, R.; Fischer, W.; Haas, R. und Waksman, G. (2003): VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion, *Embo J* 22 [9], Seite 1969-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12727865

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst habe, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben ist.

Yvette Roske

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1998 bis November 2003 in der Forschungsgruppe Kristallographie von Univ.-Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Themenbereitstellung, für die zielgerichtete Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Für die gute, kollegiale und menschlich angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei all meinen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Annette Feske, Gisela Sklenar, Ralf Bienert, Klaas Max und Andreas Knespel bedanken. Besonderen Dank richte ich an Dr. habil. Jürgen Müller und Dr. Katja Fälber für ihre praktischen Hinweise und manch wertvollen Rat.

Für die gelungene Kooperation danke ich Dr. Anwar Sunna aus dem Labor für Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, Golm, für die Bereitstellung des CsCBM27-1 und die anregende Diskussion über dieses Projekt.

Desweiteren möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Wolfgang Pfeil aus dem Labor für Physikalische Biochemie, Universität Potsdam, Golm, für die Durchführung der sehr aufschlussreichen Bindungsstudien an CsCBM27-1 bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva Müller aus der FG Neuroproteomics am MDC, die mit großer Sorgfalt die Sequenzierungen und Massenspektroskopie-Experimente durchführten.

Gedankt sei Prof. Dr. Wolfgang Höhne für die Bereitschaft diese Arbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin zu betreuen.